



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

Tesis doctoral

**MECANISMOS CELULARES RESPONSABLES DE LA
CARDIOTOXICIDAD DE LOS DIGITÁLICOS: ROL DE LA
QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO Y CALMODULINA
(CaMKII).**

Luis Alberto Gonano

Director: **Dr. Martín Vila Petroff**

Co-directora: **Dra. Alicia Mattiazzi**

2015

Muchas Gracias

A mi familia: por la libertad, confianza y apoyo.

A mis amigos: por compartir las risas y fabricar anécdotas.

A Martín: por recibirme, enseñarme y escucharme; siendo un gran director y compañero.

A Alicia: por abrirme las puertas y la pasión que demuestra.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Ale, Male, Vero, Caro, Charly, Ale Y, Juli, Gisel, Omin, Yani, Gustavo, Alex, Moni, Nacho, Coti, Ema, Eduardo, Ire, Celeste, Bernardo, Marga, Alba, Horacio, Alfredo, Luciana, Marisa, Nacho y Noe, Tamara, Manu, Leti, Matilde, Mariano, Andrés, Ramiro, Sofi y todos los que ponen algo día a día para que vaya a trabajar con alegría y entusiasmo.

A Astrid: porque Te Amo, me amas y por ser juntos.

A Clarita: porque llegaste a iluminar nuestras vidas, porque sos el nuevo gran motivo para seguir trabajando y terminar esta tesis con algo de cansancio y mucha felicidad.

Introducción	7
I. Propiedades del corazón	8
II. Manejo del Ca⁺⁺ intracelular en el corazón	9
II. a: Acoplamiento excitación-contracción (AEC) en los miocitos cardíacos	10
III. Organelas y proteínas involucradas en el manejo del Ca⁺⁺ en los cardiomiocitos	12
III.a: Membrana plasmática: Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	12
Intercambiador de Sodio y Calcio (Intercambiador Na ⁺ /Ca ⁺⁺)	13
Canales de Ca ⁺⁺ tipo L	13
III.b.Retículo Sarcoplasmático: Receptores de Rianodina (RyR)	14
SERCA y Fosfolamban	15
III.c. Mitocondrias.	16
IV. Los Glucósidos Cardiotónicos o Digitálicos.	17
IV.a. Historia y relevancia clínica de los digitálicos.	17
IV.b. Digitálicos endógenos.	19
IV.c. Efectos fisiológicos de los Digitálicos.	19
IV.d. La intoxicación digitálica.	20
V. Mecanismos arritmogénicos activados por alteraciones en el manejo del Ca⁺⁺ intracelular.	21
Va. Ondas de Ca ⁺⁺ y DADs como parte de un sustrato arritmogénico común.	23
VI. Proteína Quinasa dependiente de Calcio y Calmodulina tipo II (CaMKII).	25
VI.a. Generalidades sobre la CaMKII.	25
VI.b. Mecanismo de activación de CaMKII.	26
VI.c. Efecto de las fosforilaciones dependientes de CaMKII sobre las proteínas involucradas en el manejo del Ca ⁺⁺ :	28
Fosforilación de los canales de Ca ⁺⁺ tipo L.	28
Modulación de la liberación de Ca ⁺⁺ por el RS: fosforilación de los RyR ₂ .	29
Efectos sobre la retoma de Ca ⁺⁺ hacia el RS (fosforilación de Fosfolamban).	29
	29
Hipótesis de trabajo	30
Objetivos	31
Materiales y Métodos	32

I. Aspectos generales	33
II. Aislamiento de miocitos cardíacos: Técnica de digestión enzimática en sistema de perfusión tipo Langendorff.	33
Solución amortiguadora Hepes	
III. Registro de Ca⁺⁺ citosólico y acortamiento celular.	35
Estimación del contenido luminal de Ca ⁺⁺ en el RS	
IV. Estudio de la liberación de Ca⁺⁺ discriminada regionalmente mediante microscopía confocal.	37
V. Inmunodetección por Western Blot.	38
VI. Cultivo primario y transfección de miocitos cardíacos de rata.	39
VII. Registro electrocardiográfico en ratones.	40
VIII. Análisis estadístico.	41
IX. Cepas de ratones transgénicos utilizadas.	41
X. Inhibición farmacológica de CaMKII.	42
Resultados	43
I. El tratamiento agudo con ouabaína en dosis arritmogénicas aumenta la contractilidad y la frecuencia de contracciones espontáneas en cardiomiocitos ventriculares de rata.	44
II. El tratamiento agudo con ouabaína en dosis arritmogénicas activa a CaMKII en miocitos cardíacos de rata.	46
III. La inhibición farmacológica de CaMKII reduce el efecto arritmogénico en miocitos tratados con ouabaína sin afectar su respuesta inotrópica.	47
IV. Efecto inotrópico y arritmogénico del tratamiento con ouabaína en ratones que expresan un inhibidor endógeno de CaMKII.	49
V. La sobreexpresión de CaMKII exacerba el efecto arritmogénico del tratamiento con ouabaína en cardiomiocitos de rata.	51
VI. Mecanismo por el cual CaMKII promueve liberaciones proaritmogénicas de Ca⁺⁺.	54
VI.a. Contenido de calcio dentro del retículo sarcoplasmático durante el tratamiento con altas concentraciones de ouabaína.	55
VI.b. CaMKII fosforila a los RyR ₂ aumentando la liberación espontánea de Ca ⁺⁺ del RS durante el tratamiento con concentraciones arritmogénicas de ouabaína.	58
VII. La inhibición de CaMKII es capaz de prevenir la aparición de arritmias ventriculares en un modelo <i>In Vivo</i> de intoxicación digitalica aguda.	61

VIII. El tratamiento agudo con altas concentraciones de digoxina reproduce el mecanismo fisiopatológico activado durante el tratamiento con ouabaína.	63
IX. Estabilización de los receptores de rianodina como alternativa en la prevención de arritmias inducidas por digitálicos.	65
IX.a. El Carvediol es capaz de reducir el número de CE registrado en cardiomiocitos tratados con ouabaína.	66
IX.b. VK-II-86 es capaz de prevenir el aumento en la frecuencia de CE, sin afectar la respuesta inotrópica al tratamiento con ouabaína en cardiomiocitos de rata.	68
Discusión	70
I. Aspectos generales	71
II. Activación de CaMKII durante el tratamiento con Digitálicos.	72
III. Mecanismo por el cual CaMKII promueve arritmias.	73
III.a. Integración del mecanismo arritmogénico estudiado en cardiomiocitos dentro de la escala tisular.	73
III.b. Fosforilaciones mediadas por CaMKII y generación de ondas arritmogénicas de Ca ⁺⁺ a nivel celular.	74
III.c. La fosforilación de los RyR ₂ en el residuo Ser-2814 es clave en el proceso arritmogénico desencadenado por los digitálicos.	76
IV. Posible papel desempeñado por las mitocondrias en las arritmias inducidas por digitálicos.	77
V. La actividad de CaMKII no es necesaria para alcanzar una respuesta inotrópica adecuada.	79
VI. La activación de CaMKII cumple un papel determinante en el desarrollo de arritmias letales por intoxicación digitálica aguda.	80
VII. Estabilización de los RyR₂ como alternativa terapéutica para prevenir las arritmias inducidas por digitálicos.	80
VIII. Conclusiones y Aplicaciones potenciales de los resultados obtenidos.	82
IX. Limitaciones y perspectivas a futuro.	84
IX.a. Limitaciones: Posible efecto dependiente de CaMKII sobre la corriente de Ca ⁺⁺ .	85
IX.b. Experimentos futuros.	86
Referencias bibliográficas.	87

Lista de abreviaturas

AEC: Acoplamiento excitación-contracción o éxcito-contráctil.

A-V: Aurículo Ventricular

CaMKII: Quinasa dependiente de Ca^{++} y Calcodulina tipo II.

DAD: Post-despolarización tardía (Delayed After Depolarization)

EAD: Post-despolarización temprana (Early After depolarization)

IC: Insuficiencia Cardíaca

MCU: Transportador mitocondrial de Ca^{++} (Mitochondrial Calcium Uniporter)

mNCX: Intercambiador Na^+/Ca^{++} mitocondrial.

NCX: Intercambiador Na^+/Ca^{++} .

NKA: ATPasa de Na^+ y K^+ .

PA: Potencial de Acción

PLB: Fosfolamban.

RyR: Receptor de Rianodina.

RyR₂: Receptor de Rianodina tipo II o cardíaco.

RS: Retículo Sarcoplasmático

SERCA: Bomba de transporte activo de Ca^{++} del RS.

Introducción

I. Propiedades del corazón.

El corazón es un órgano que combina 5 propiedades fisiológicas fundamentales para cumplir con su función vital que es generar flujo de sangre a través del organismo en forma constante y adecuada según los requerimientos tisulares. Dichas propiedades se definen a continuación:

- 1- Cronotropismo (automatismo): capacidad de originar potenciales de acción (PA) en forma automática. Se debe a la despolarización espontánea del potencial de membrana en grupos de células especializadas, ubicadas en regiones específicas como el nodo sinusal, el aurículo-ventricular (A-V) y el sistema His-Purkinje.
- 2- Batmotropismo (excitabilidad): capacidad del conjunto de la masa muscular cardíaca de regenerar PA en respuesta a la llegada de un estímulo despolarizante.
- 3- Dromotropismo (conductibilidad): capacidad de conducir potenciales de acción a lo largo del tejido, permitiendo la despolarización rápida y sincronizada.
- 4- Inotropismo (contractilidad): capacidad de generar una respuesta mecánica de acortamiento a nivel celular. Permite desarrollar la fuerza necesaria para reducir el volumen de las cámaras cardíacas y expulsar la sangre contenida en ellas.
- 5- Lusitropismo (relajación): capacidad de recobrar la longitud inicial luego de cada contracción.

Utilizando un criterio fisiológico podemos considerar dos subtipos celulares que dan sustento a las propiedades cardíacas. Estos son: células especializadas en la generación y conducción rápida de potenciales de acción; y células especializadas en la contracción y relajación.

En las células del nodo sinusal, nodo A-V y sistema His-Purkinje reside la capacidad de generar PA en forma automática, siendo la frecuencia de descarga del nodo sinusal la que determina el ritmo cardíaco en condiciones normales.

Tal como se observa en el panel A de la figura 1, el sistema His-Purkinje constituye una vía especializada en la conducción rápida de los PA, que conjuntamente con el nodo sinusal y el A-V conforman el sistema cardionector (resaltado en rojo). Los estímulos eléctricos recorren el sistema cardionector gracias a la conexión especializada entre células adyacentes, que como puede observarse en el panel B de la figura 1, ocurre a través del acoplamiento de hemicanales proteicos (conexones) que forman uniones de hendidura o "GAP junctions". Sin embargo, el acoplamiento mediado por conexones no se limita al sistema cardionector, sino que está presente en todo el corazón y permite que la despolarización alcance la membrana de cada cardiomiocito (Hervé JC. Pathol Biol 2008).

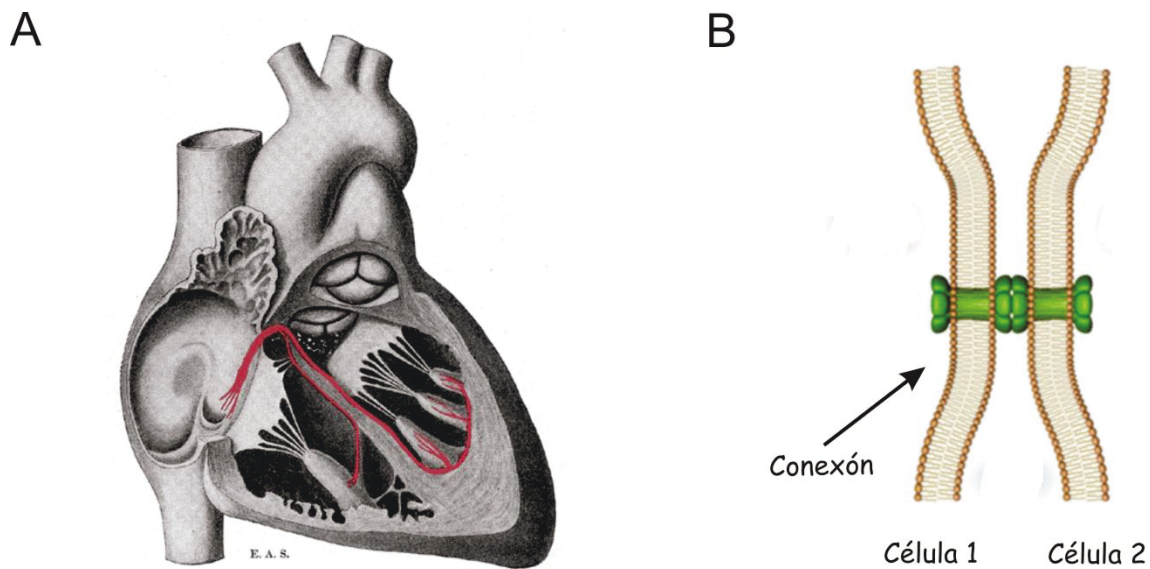


Figura 1: **A.** Ilustración del corazón humano. En rojo se encuentran esquematizadas las vías especializadas en la conducción de impulsos. Modificada de: “Gray's Anatomy of the Human Body”, 1918. Imagen de dominio público, Wikimedia Commons. **B.** Esquema que señala el acoplamiento entre dos cardiomiocitos adyacentes mediado por oposición de 2 conexones que forman una unión de hendidura o GAP junction.

Por otra parte, las células que constituyen la unidad contráctil del tejido cardíaco son los cardiomiocitos. Uno de los principales determinantes del estado inotrópico de estas células es la amplitud de los “transitorios de Ca^{++} ”, término utilizado para referirse al aumento transitorio en la concentración citosólica de Ca^{++} ($[\text{Ca}^{++}]_{\text{citosol}}$) que ocurre en forma sucesiva a lo largo del ciclo cardíaco.

II. Manejo del Ca^{++} intracelular en el corazón.

En los cardiomiocitos, la amplitud de los transitorios de Ca^{++} depende del flujo neto de este ión a través de la membrana plasmática y de su distribución en los distintos compartimentos intracelulares. Al conjunto de procesos que participan en la dinámica del flujo de Ca^{++} intracelular, se los denomina “manejo del Ca^{++} ” (en inglés: calcium handling). Las características del manejo del Ca^{++} intracelular determinan el estado inotrópico del músculo cardíaco, y sus alteraciones ocurridas a nivel celular son causa de disfunción contráctil (Bers DM. *Physiology* 2006), hipertrofia cardíaca (Wilkins BJ. *Biochem Biophys Res Commun* 2004) y arritmias (Clusin WT. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003).

La capacidad de acortarse que caracteriza a los cardiomiocitos depende de la interacción entre las proteínas actina y miosina, que forman parte del aparato contráctil organizado en unidades estructurales llamadas sarcómeros. El evento que determina la interacción entre actina y miosina es el aumento en la $[Ca^{++}]$ a nivel sarcomérico, ya que activa un mecanismo que se ha descrito clásicamente como dependiente de la interacción de los iones Ca^{++} con la proteína reguladora Troponina C (Bers DM. Nature 2002).

En esta sección se describirá el mecanismo de acoplamiento entre la excitación y la contracción del músculo cardíaco, en el que el Ca^{++} es la molécula clave que permite la transición desde el estímulo eléctrico que recorre la membrana plasmática (PA) hasta la respuesta mecánica que implica el acortamiento de los sarcómeros.

II.a: Acoplamiento excitación-contracción (AEC) en los miocitos cardíacos.

Durante un potencial de acción, el Ca^{++} ingresa a los cardiomiocitos a través de los canales de Ca^{++} de tipo L operados por voltaje (también conocidos como receptores de dihidropiridinas) y al unirse a los receptores de rianodina (RyR) del Retículo Sarcoplasmático (RS) induce la liberación del Ca^{++} almacenado en esta organela. Este proceso, esquematizado en la figura 2, ha sido clásicamente descrito como “liberación de Ca^{++} inducida por Ca^{++} ” y permite el aumento en la concentración citosólica de Ca^{++} responsable de la activación de las proteínas contráctiles (Fabiato A. Annu Rev Physiol 1979).

Posteriormente, para que el corazón cumpla eficazmente con su función de bomba debe ocurrir la relajación mecánica de los cardiomiocitos, que permite el llenado diastólico de las cámaras cardíacas. Esto requiere de la reducción en la concentración citosólica de Ca^{++} , que ocurre mediante dos vías principales: secuestro del ión hacia el RS a cargo de la bomba de transporte activo de Ca^{++} del RS (SERCA) y extrusión del mismo hacia el espacio extracelular, mediada por el intercambiador de Na^+ y Ca^{++} (NCX).

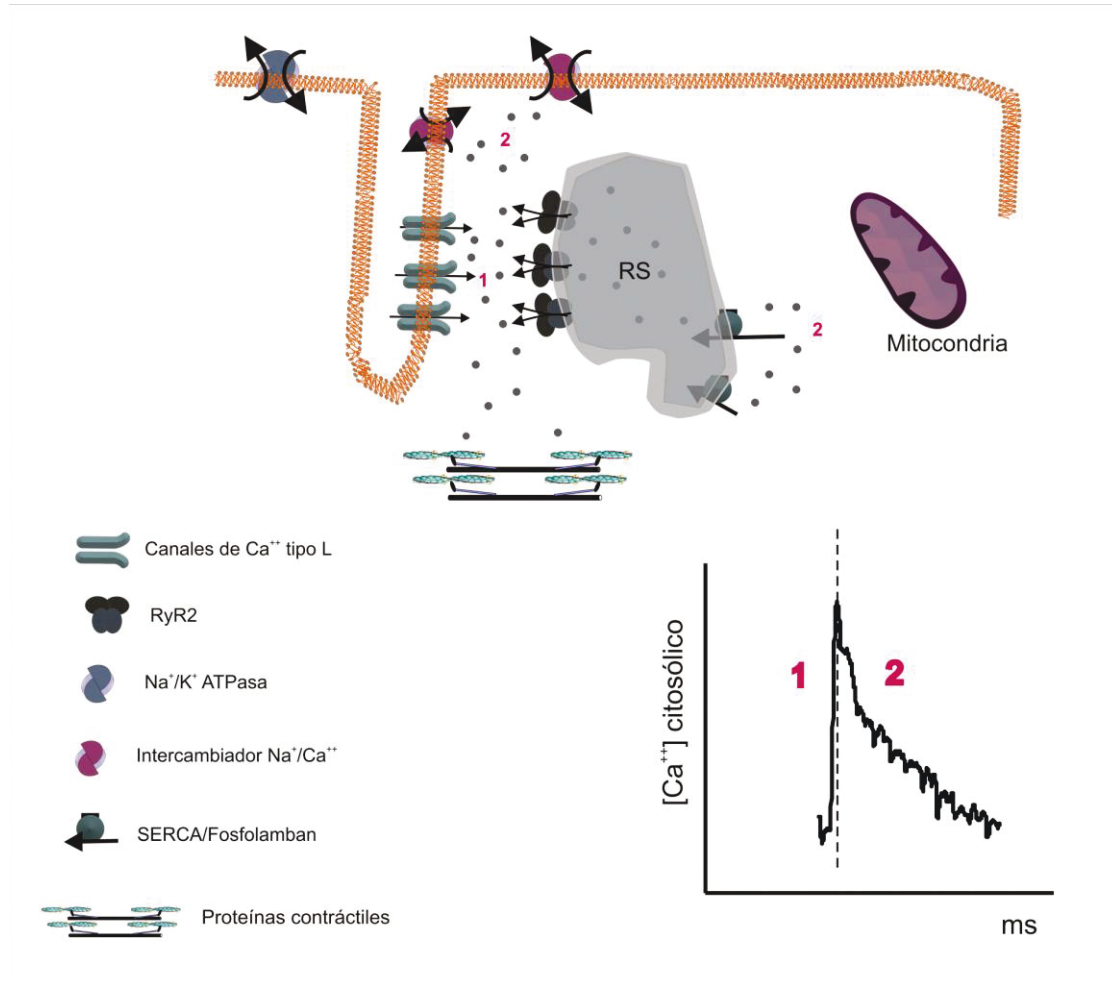


Figura 2: Esquema que incluye a las principales proteínas involucradas en el flujo intracelular de Ca^{++} durante el AEC (1), y aquellas necesarias para la posterior reducción en la concentración citosólica de Ca^{++} que permita la relajación mecánica (2).

Los iones Ca^{++} no sólo median el acoplamiento excitación-contracción en forma directa sino que también lo regulan en forma indirecta. Esto se debe a la existencia de enzimas sensibles a los niveles intracelulares de Ca^{++} , que son capaces de regular la función de proteínas involucradas en el manejo del Ca^{++} y ejercer lo que podríamos llamar sintonía fina del AEC. Entre estas proteínas se encuentran las quinasas sensibles al complejo Ca^{++} /Calmodulina, siendo la predominante a nivel cardíaco la Ca^{++} /Calmodulina Quinasa II (CaMKII) (De Koninck P. Science 1998; Maier LS. J Mol Cell Cardiol 2002).

En las próximas secciones se describen los aspectos más relevantes de aquellas organelas y proteínas involucradas en el manejo del Ca^{++} intracelular.

III. Organelas y proteínas involucradas en el manejo del Ca^{++} en los cardiomiocitos.

III.a. Membrana plasmática.

Na^+/K^+ ATPasa

La bomba de sodio y potasio o Na^+/K^+ ATPasa (NKA) es una proteína integral de membrana presente en prácticamente todos los tipos celulares de organismos eucariotas (Skou JC. Biosci Rep 2004). A nivel estructural, es un hetero-dímero compuesto por subunidades α y β . La subunidad α presenta actividad catalítica, y la subunidad β es necesaria para su ensamblaje y anclaje en la membrana plasmática (Blanco G. American Journal of Physiology 1998; Kawamura A. Proc Natl Acad Sci 1999).

La denominación “bomba” se debe a su capacidad de intercambiar iones Na^+ por iones K^+ en un proceso de transporte activo (que obtiene energía de la hidrólisis de ATP), en el cual son extruidos 3 iones Na^+ por cada 2 iones K^+ que ingresan a la célula. Su actividad es necesaria para mantener el gradiente electroquímico de Na^+ y K^+ que permite el flujo transmembrana de estos iones durante el potencial de acción (Mc Donough AA. Basic Res Cardiol 2002).

Intercambiador de Sodio y Calcio (Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$)

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (NCX), es un transportador de membrana que se localiza preferentemente a nivel de los túbulos T (Yang Z. Circ Res 2002) y media el contra-transporte electrogénico de Na^+ y Ca^{++} a través de la membrana plasmática de los cardiomiocitos.

Su funcionamiento depende del gradiente electroquímico de ambos iones, del potencial de membrana y de la temperatura (Goldhaber JI. Adv Exp Med Biol 2013).

Tal como es representado en la figura 3, se describen un modo directo y un modo reverso en el accionar del NCX según el sentido con el que ambos iones son transportados. En el modo directo ingresan 3 iones Na^+ por cada ión Ca^{++} que es extruido. Por su parte, el modo reverso implica la extrusión de 3 iones Na^+ acoplada al ingreso de un Ca^{++} .

Normalmente el modo directo participa en la extrusión de Ca^{++} hacia el espacio extracelular durante el período diastólico (Goldhaber JI. Adv Exp Med Biol 2013); mientras que el modo reverso ingresa Ca^{++} en la fase temprana del PA (Bers D. Physiology 2006), previo a la activación de los canales tipo L (Weber CR. Circ Res 2002) (cuando el ingreso de Na^+ al citosol determina un aumento en la fuerza impulsora para su salida en intercambio con Ca^{++}). La

entrada de Ca^{++} en esta ventana de tiempo es limitada, aunque puede aumentar en condiciones fisiológicas o patológicas que cursan con un incremento en la concentración intracelular de Na^+ (Satoh H. Circulation 2000).

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$

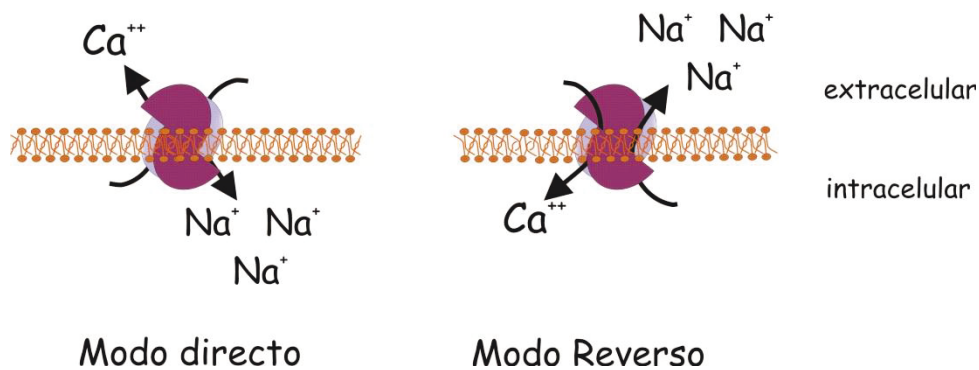


Figura 3: Esquema que muestra los dos modos de intercambio de 3 Na^+ por 1 Ca^{++} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ ubicado en la membrana plasmática de los cardiomiocitos.

Canales de Ca^{++} tipo L

La corriente de Ca^{++} que atraviesa la membrana plasmática durante la meseta del PA de los cardiomiocitos, fluye a través de los canales de Ca^{++} de tipo L cuya isoforma principal en estas células es la $\text{Cav} 1.2 \alpha 1$. Estos canales contienen 4 subunidades de 6 segmentos transmembrana cada una, de los cuales el segmento S4 actúa como sensor de voltaje (Bers DM. Front Pharmacol 2014).

La apertura de estos canales responde a la despolarización impuesta por la corriente de Na^+ que ocurre durante la fase cero del PA, luego durante la fase 2 o meseta esta corriente se inactiva progresivamente. Su función es afectada por mecanismos de regulación que dependen de los iones Ca^{++} en forma directa o indirecta. Uno de ellos es el fenómeno de "inactivación dependiente de Ca^{++} ", en el que el ión permeante regula la función del canal, limitando la duración del PA cardíaco al permitir que las corrientes de K^+ repolaricen el potencial de membrana (Brehm P. Science 1978; Pitt GS. Cardiovasc Res 2007). Adicionalmente, existe un efecto indirecto que depende de la activación de la CaMKII , que se describe como "Facilitación" de la corriente de Ca^{++} (Pitt GS. Cardiovasc Res 2007).

III.b. Retículo Sarcoplasmático.

Receptores de Rianodina (RyR)

Los receptores de rianodina (RyR) son proteínas integrales de la membrana del RS, en donde actúan como canales de Ca^{++} que permiten la salida de este ión hacia el citosol. Deben su nombre a su capacidad para interactuar con el alcaloide Rianodina (proveniente de la planta *Ryania speciosa*), lo que no implica que su rol fisiológico sea el de actuar como receptores de esta molécula del modo en que otras proteínas son receptores de ligandos endógenos. Sin embargo, gracias a este alcaloide se pudo purificar y determinar la localización subcelular del receptor, el cual se encuentra principalmente en las cisternas terminales del RS (Inui M. J Biol Chem. 1987).

Existen tres isoformas de esta proteína, siendo los RyR₁ predominantes en músculo esquelético, los RyR₂ predominantes en el corazón y los RyR₃ en el cerebro (Lanner J. T Cold Spring Harb Perspect Biol 2010). Dada la temática abordada en esta tesis, en adelante nos centraremos en los RyR₂ que son complejos macromoleculares homo-tetraméricos compuestos por 4 subunidades de 565 KDa cada una. Los mismos se insertan en la membrana del RS conformando grupos (en inglés “clusters”) de 30 a 250 RyR₂ (Franzini-Armstrong C. Biophys J 1999).

La probabilidad de que estos canales se abran permitiendo el flujo de Ca^{++} es afectada por su interacción con cationes intracelulares (el mismo ión Ca^{++} , además de Mg^{++} y H^+) y proteínas tales como Sorcina, Calstabin-2, Triadina, Juntina y Calsecuestrina (Gyorke S. Cardiovasc Res 2008; Niggli E. Bioch Biophys Acta 2012).

Adicionalmente, su función es afectada por modificaciones post-traduccionales tales como la nitrosilación, oxidación o la fosforilación en residuos aminoacídicos específicos (Meissner G. Curr Top Membr 2010; Donoso P. Front Biosci 2011). Hasta el momento tres residuos específicos de Serina (Ser) han sido descritos como blancos fosforilables: Ser-2808, Ser-2030 y Ser-2814 (Xiao B. Biochem J 2006; Ferrero P. J Mol Cel Cardiol 2007; Huke S. Bioch Biophys Res Commun 2008). La proteína quinasa A (PKA) y la CaMKII son las más extensamente descritas como capaces de fosforilar a estos sitios en situaciones fisiológicas y patológicas, aunque también ha sido demostrado que la proteína quinasa G (PKG) es capaz de fosforilar al residuo Ser-2808 (Xiao B. Biochem J 2006; Gonano LA-Morell M. Card Res 2014). En conjunto, estos residuos fosforilables se encuentran en la cara citosólica del canal, conformando lo que en inglés se denomina “phosphorylation hot spot” (figura 4).

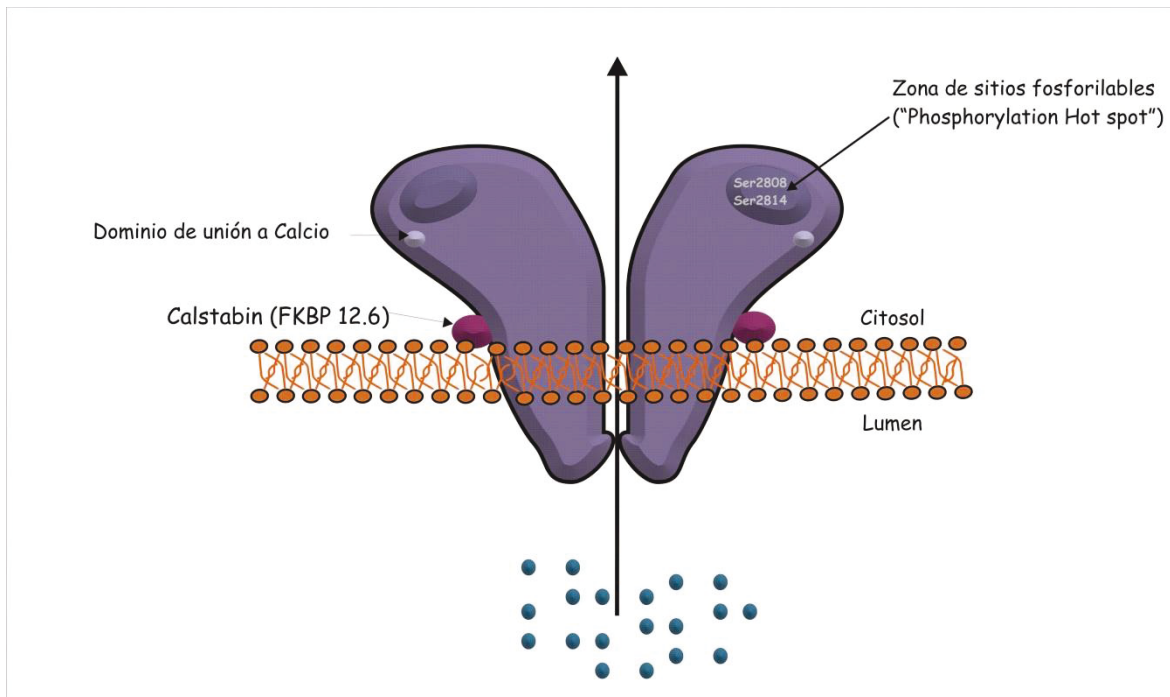


Figura 4: Representación esquemática del receptor de rianodina de tipo 2, que incluye ejemplos de su regulación por fosforilación e interacción con proteínas.

Durante el AEC la apertura de los RyR₂ es activada por la unión de Ca⁺⁺ a su cara citosólica, aunque existe una región sensible a Ca⁺⁺ en su cara luminal (Gyorke I. *Biophys J* 1998; Gyorke S. *Cardiovasc Res.* 2008). La liberación global de Ca⁺⁺ hacia el citosol (transitorio de Ca⁺⁺) es la resultante de un conjunto de eventos locales de liberación que ocurren en forma sincronizada mediante el proceso de liberación de Ca⁺⁺ inducida por Ca⁺⁺ (Cheng H. *Science* 1993).

Cada uno de estos eventos locales corresponde a la liberación de Ca⁺⁺ desde un “cluster” de RyR₂. Una fracción importante de estos “clusters” co-localiza con grupos de canales de Ca⁺⁺ de tipo L, formando en conjunto unidades llamadas Díadas (en inglés: “couplons”) (Bers DM. *Ann NY Acad Sci* 2005).

La actividad de los “clusters” de RyR₂ puede ser monitoreada por microscopía confocal registrando la liberación de Ca⁺⁺ desde el RS hacia el citosol, que será detectada como una chispa de Ca⁺⁺ (en inglés: “Ca⁺⁺ spark”) dado su carácter local y transitorio.

Las ocurrencia de chispas de Ca⁺⁺ no solo se da en forma sincronizada durante el AEC, sino que también ocurre como un evento estocástico durante el período diastólico y permite la pérdida o fuga de Ca⁺⁺ desde el RS hacia el citosol (en inglés: “SR Calcium leak”) (Sobie et al., *Prog Biophys Mol Biol.* 2006). La pérdida diastólica de Ca⁺⁺ es mayor en condiciones de

sobrecarga de Ca^{++} dentro del RS (Shannon TR. *Circ Res* 2002), debido a un fenómeno que algunos investigadores denominan SOIRC (Store Overload-Induced Calcium Release) (Priori S. *Circ Res* 2011). Este fenómeno puede comprenderse teniendo en cuenta que los RyR_2 poseen una región sensible a la concentración luminal de Ca^{++} ($[\text{Ca}^{++}]_{\text{RS}}$), la cual es capaz de aumentar su probabilidad de apertura en función de la $[\text{Ca}^{++}]$ dentro del RS (Gyorke S. *Cardiovasc Res.* 2008; Chen W. *Nat Med* 2014).

SERCA y Fosfolamban

Como se mencionó previamente, la bomba de Ca^{++} del RS denominada SERCA es una ATPasa que lleva adelante el transporte activo de Ca^{++} hacia el lumen del RS durante el período diastólico. Su funcionamiento tiene impacto sobre la velocidad de relajación, ya que ésta depende de la velocidad de decaimiento en la $[\text{Ca}^{++}]_{\text{citosólica}}$; y sobre el contenido de Ca^{++} del RS, que a su vez, impacta sobre la contractilidad (Frank KF. *Cardiovasc Res* 2003).

Dentro del lumen del RS los iones Ca^{++} se unen a la proteína Calsequestrina, lo que permite almacenar este ión en concentraciones superiores a 20 mM, mientras su concentración citosólica es cercana a 1 mM (Beard N. *Prog Biophys Mol Biol* 2004).

El secuestro de Ca^{++} hacia el lumen del RS mediado por SERCA se encuentra sujeto a regulación, mediante un mecanismo que depende de la interacción entre SERCA y una proteína regulatoria llamada Fosfolamban (PLB). El transporte de Ca^{++} resulta inhibido cuando ambas se encuentran en interacción física (MacLennan DH. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003); aunque este fenómeno es reversible dado que cuando PLB es fosforilada la interacción entre ambas proteínas es menos estable.

PLB puede ser fosforilada por la proteína quinasa A (PKA) en el residuo Serina 16 (Ser-16) o por CaMKII en el residuo Treonina 17 (Thr-17). Estas fosforilaciones median el incremento en la velocidad de relajación y el aumento en el contenido de Ca^{++} del RS durante la estimulación β -adrenérgica (para más detalle ver: Brittsan AG. *J Mol Cell Cardiol* 2000; Mattiazzi A. *Front Pharmacol* 2014).

III.c. Mitocondrias.

Las mitocondrias son organelas intracelulares especializadas en la síntesis de ATP que ocupan cerca de un 35 % del volumen de los cardiomiocitos (Barth E. *J Mol Cell Cardiol* 1992), lo que refleja la alta demanda energética de estas células. Estas organelas son también capaces de captar y extruir Ca^{++} , ya que poseen transportadores y canales localizados en

su membrana interna. La presencia de Ca^{++} en la matriz mitocondrial es necesaria para la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs, por lo que está ligada a la producción de energía en estas organelas (Di Benedetto G. Cell Metab 2013).

De los transportadores descritos hasta el momento en la membrana mitocondrial interna, los que ejercen un rol importante en el transporte de Ca^{++} son: el “uniporter” mitocondrial de Ca^{++} (MCU) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ mitocondrial (mNCX). El MCU es un canal que permite el ingreso de Ca^{++} a la matriz mitocondrial; por su parte el mNCX media la salida de Ca^{++} desde las mitocondrias hacia el citosol en intercambio con Na^+ (Gunter & Pfeiffer, 1990; Bernardi, 1999).

Actualmente diversos grupos de investigación intentan determinar la importancia de la captación de Ca^{++} hacia la matriz mitocondrial mediada por el MCU en la conformación de los transitorios de Ca^{++} citosólico durante el ciclado latido a latido. Sin embargo, la cinética con la que las mitocondrias captan Ca^{++} durante el ciclo cardíaco permanece controversial. El principal impedimento para que los transitorios de Ca^{++} citosólico deriven en fluctuaciones rápidas en la $[\text{Ca}^{++}]_{\text{mitocondrial}}$, es que el MCU tiene una cinética lenta de transporte de Ca^{++} (O' Rourke B. J Mol Cell Cardiol 2009).

IV. Los Glucósidos Cardiotónicos o Digitálicos.

Los Glucósidos Cardiotónicos o Digitálicos son un grupo de metabolitos secundarios provenientes de plantas del género *Digitalis* spp, cuya propiedad farmacológica fundamental es la capacidad de inhibir el transporte de Na^+ y K^+ mediado por la NKA. Dentro de este grupo de compuestos, los más utilizados con fines terapéuticos y estudiados a nivel experimental son ouabaína, digoxina y digitoxina.

IV.a. Historia y relevancia clínica de los digitálicos.

Desde que en 1785 el botánico Inglés, William Withering, describió la utilización de extractos de *Digitalis purpurea* con fines terapéuticos en su obra “*An account of the foxglove and some of its medical uses*” (citado por Wilkins MR. Br Med J 1985) (figura 5), los digitálicos han tenido un importante rol en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (IC). Sin embargo, durante el último siglo su utilización se convirtió en foco de debate, debido a la falta de certeza sobre su eficacia para alterar la historia natural de la IC y la posibilidad de que durante su administración aparezcan efectos tóxicos.



Figura 5: Ilustración e imagen que muestran a la *Digitalis purpurea* o Foxglove, cuyas propiedades fueron descritas por William Withering en 1785. La ilustración proviene de “Köhler, F. E. Atlas zur Pharmacopoea germanica Gera Untermhaus” de uso público.

Sin embargo, como prueba de la importancia de la digoxina en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, dos ensayos clínicos demostraron que la suspensión del tratamiento con digoxina se asocia con el empeoramiento clínico de los pacientes, aún aquellos con insuficiencia cardíaca moderada (Uretsky BF. J Am Coll Cardiol 1993; Packer MN. Engl J Med 1993).

Posteriormente, la publicación de los resultados obtenidos durante el “Digitalis Investigation Group (DIG) trial” que estudió a más de 6.500 pacientes con insuficiencia cardíaca, no mostró diferencias en la mortalidad a largo plazo entre el grupo tratado con 0.25 mg/día de digoxina y el grupo tratado con placebo. Sin embargo, demostró una reducción en la frecuencia de internaciones/decesos derivados del deterioro en la función contráctil (The Digitalis Investigation Group Investigators. N Engl J Med 1997). En los años posteriores a la publicación de los resultados del DIG se produjo un marcado descenso en la utilización de digitálicos, dada la aparición de tratamientos capaces de reducir la mortalidad a largo plazo, tales como la utilización de β -bloqueantes (Hunt SA. Circulation 2009).

Sin embargo, en los últimos años se han publicado resultados derivados del análisis de grupos específicos de pacientes incluidos en el DIG. Estos demuestran que los pacientes con insuficiencia cardíaca de alto riesgo (IC grado 3-4, fracción de eyección <25% o índice cardiorácico >55%) se ven particularmente beneficiados por el tratamiento con digoxina, con una reducción en el riesgo de hospitalización y en la mortalidad en un período de 2 años (Gheorghiade M. Eur J Heart Fail 2013).

Actualmente, la utilización de digoxina sigue siendo recomendada dentro de las guías para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, y para reducir la frecuencia de respuesta ventricular en pacientes con fibrilación auricular (Gheorghide M. *Circulation* 2004). Se utiliza en pacientes con insuficiencia cardíaca y ritmo sinusal, que continúen sintomáticos a pesar de recibir tratamiento estándar (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y β -bloqueantes). También se indica en pacientes con fibrilación auricular con respuesta ventricular rápida. Independientemente de cual sea su indicación, siempre se recomienda su utilización en dosis baja de 0.125 mg/día.

Finalmente, el interés actual por la utilización farmacológica de los digitálicos no está restringido al tratamiento de patologías cardiovasculares, dado que múltiples investigaciones demuestran que estos compuestos tienen propiedades antiproliferativas, lo que motiva el estudio de su utilidad en diversas terapias antitumorales (McConkey DJ. *Cancer Res* 2000).

IV.b. Digitálicos endógenos.

Más allá de la existencia de digitálicos derivados de las plantas, varios compuestos endógenos similares a la ouabaína (Digital like-factors) han sido identificados en animales y humanos. Interesantemente, la ouabaína endógena identificada en plasma humano posee estructura, características biológicas y propiedades inmunológicas indistinguibles de la ouabaína derivada de las plantas (Bagrov AY. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008).

Estos digitálicos endógenos cumplen un importante rol en diferentes situaciones patológicas, tales como la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca congestiva y la génesis de arritmias ventriculares (Bagrov AY. *Cardiovasc Res*. 1993). En conjunto, consideramos que el estudio de los eventos intracelulares desencadenados por la inhibición de la NKA con ouabaína podría aportar información valiosa para el tratamiento de estas patologías.

IV.c. Efectos fisiológicos de los Digitálicos.

Como característica general, los digitálicos son capaces de unirse a la subunidad alfa de la Na^+/K^+ ATPasa, inhibiendo el transporte de estos iones, lo cual conduce a un incremento en la concentración intracelular de Na^+ (Despa S. *Cardiovasc Res* 2012). Su efecto más reconocido es el aumento en la contractilidad miocárdica, que ha sido demostrado tanto en corazones sanos como insuficientes (Hauptman. *Circulation* 1999, Hassenfuss 1996) y que resulta de su acción directa sobre los miocitos cardíacos. En estas células, el aumento en

la concentración intracelular de Na^+ modifica la fuerza impulsora para el intercambio de Na^+ y Ca^{++} mediado por el NCX. La alteración en el transporte de Ca^{++} conduce a su acumulación intracelular, lo cual explica el incremento en la contractilidad del músculo auricular y ventricular (efecto inotrópico positivo). Adicionalmente el aumento de Na^+ intracelular puede producir cambios en el potencial de membrana en reposo, en la excitabilidad y en la velocidad de conducción de las fibras cardíacas (Hauptman. *Circulation* 1999).

La consecuencia fundamental del efecto inotrópico de los digitálicos es el incremento en el volumen sistólico, que mejora el estado hemodinámico y reduce la hiperactividad simpática con la que cursa la IC. Por este motivo, producen una reducción en los niveles de renina y adrenalina circulante (Hauptman. *Circulation* 1999).

Paralelamente tienen efectos directos sobre el sistema nervioso autónomo, ya que actuando sobre las células del seno carotídeo incrementan la sensibilidad del reflejo baroreceptor, que se encuentra reducida en la IC. En dosis terapéuticas incrementan el tono vagal, reduciendo la velocidad de conducción sino-atrial y auriculo-ventricular y la frecuencia de descarga sinusal (efecto vagotónico). Al conjunto de estos efectos directos e indirectos sobre el sistema nervioso autónomo se debe parte de su eficacia terapéutica en el tratamiento de la IC (Hauptman. *Circulation* 1999, Gheorghide M. *Circulation* 2004).

A nivel celular, distintos grupos de investigación proponen que la unión de ouabaína a la NKA altera su interacción con proteínas vecinas, activando vías hipertróficas e incrementando la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) mediante mecanismos que involucran a múltiples moléculas de señalización (Liu J. *J Biol Chem* 2000; Xie Z. *Cell Mol Biol* 2001). Esto sería independiente de la alteración en la homeostasis del Ca^{++} que ocurre como consecuencia de la inhibición del transporte de Na^+ . Una prueba en este sentido es que la ouabaína es capaz de activar un mecanismo hipertrófico que ocurre aún en ratones que no expresan el NCX (Bai Y. *Am J Physiol* 2013).

También existe un grupo de investigación que ha propuesto la existencia de un efecto directo de los digitálicos sobre los RyR_2 (Sagawa T. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002), el cual podría estar implicado tanto en el efecto inotrópico positivo como en la generación de un sustrato arritmogénico. Sin embargo, este aumento en la probabilidad de apertura de los RyR_2 , promovido por interacción directa con los digitálicos, no ha sido hasta el momento un mecanismo reproducido y aceptado por otros grupos de investigación. De hecho, existen evidencias que demuestran que los digitálicos no son capaces de aumentar la contractilidad cardíaca mediante mecanismos independientes a la alteración en la homeostasis del Na^+ (Altamirano J. *J Physiol* 2006).

IV.d. La intoxicación digitálica.

La complicación más temida durante la intoxicación digitálica es la aparición de arritmias, pero este cuadro clínico también cursa con alteraciones gastrointestinales y del sistema nervioso central. Suele ser causado por la presencia de altas concentraciones de digitálicos en el plasma, pero también es posible su aparición durante el tratamiento con dosis terapéuticas, si se asocian interacciones medicamentosas (Diuréticos no ahorradores de potasio) o condiciones patológicas que reducen su excreción (insuficiencia renal) (Gheorghide M. Circulation 2004).

En un estudio que involucró a 150 pacientes con diagnóstico de intoxicación digitálica, las arritmias más frecuentes fueron: bloqueo A-V de 2° o 3° grado (53 % de los casos), taquicardia ventricular y fibrilación ventricular (46 y 33 % de los casos respectivamente) (Antman EM. Circulation.1990). Por otra parte, concentraciones sub-tóxicas de digitálicos pueden promover arritmias en condiciones de isquemia (Lown B. N Engl J Med. 1977; Kim DH. J Pharmacol Exp Ther 1983) y también se ha demostrado que los digitálicos endógenos predisponen a la aparición de arritmias ventriculares durante episodios isquémicos (Bagrov AY. Cardiovasc Res. 1993).

A nivel electrocardiográfico debe distinguirse entre: **efecto digitálico** (depresión del segmento ST), **exceso digitálico** (bloqueo A-V de segundo grado) e **intoxicación digitálica** (arritmias ventriculares) (Gheorghide M.Circulation.2004). Un patrón característico de cardiotoxicidad digitálica es la combinación de aumento del automatismo con una velocidad de conducción deprimida. A altas dosis, por ejemplo, el marcapaso de la unión A-V puede comenzar a descargar a una frecuencia mayor a la que normalmente demuestra, lo que en un contexto de baja frecuencia de descarga sinusal resulta en una "taquicardia de la unión A-V" (Hauptman. Circulation 1999; Ma G J Emerg Med. 2001).

V. Mecanismos arritmogénicos activados por alteraciones en el manejo del Ca^{++} intracelular.

Como ya se mencionó, el ritmo cardíaco normal resulta de la propagación de PA originados en el nódulo sinusal y capaces de despolarizar el potencial de membrana de aurículas y ventrículos sucesivamente. Sin embargo, este ritmo y secuencia pueden sufrir alteraciones que comprometan la función cardíaca, ya sea en forma transitoria o sostenida. En la Tabla 1, se resumen los principales mecanismos capaces de originar o sostener arritmias cardíacas.

Mecanismos arritmogénicos generales

- | | |
|---|---|
| 1- Anomalías en la formación del impulso: | a. Actividad Gatillada (por post-despolarizaciones) |
| | b. Automatismo aumentado |
| 2- Anomalías en la conducción del impulso: | a. Retrasos o bloqueos en la conducción |
| | b. Reentradas |
| 3- Combinación de los mecanismos anteriores | |

Tabla 1. Clasificación general de los mecanismos generadores de arritmias cardíacas. Basado en: Zipes DP. J Cardiovasc Electrophysiol 2003.

La expresión más grave de las arritmias cardíacas es la muerte súbita. En este sentido la taquicardia ventricular y posterior fibrilación es causa de muerte súbita en pacientes con insuficiencia cardíaca, y en más del 50 % de estos casos depende de mecanismos no reentrantes (Pogwizd SM. Circulation 1998; Pogwizd SM. Circulation 1994), caracterizados por la descarga desde focos ectópicos que desencadenan arritmias por actividad gatillada.

Se considera actividad gatillada a la generación anómala de potenciales de acción que ocurre a partir de post-despolarizaciones, que son despolarizaciones del potencial de membrana no causadas por la llegada de un potencial de acción de origen sinusal, sino dependientes de corrientes despolarizantes activadas por mecanismos intracelulares.

Según su relación temporal con el PA previo se clasifican como: post-despolarizaciones tempranas o EADs (Early After Depolarizations), aquellas que ocurren durante la fase 2 o 3 del PA; y post-despolarizaciones tardías o DADs (Delayed After Depolarizations), las acontecidas luego de completada la repolarización.

La generación de EADs es facilitada por la prolongación del PA, ya que en este contexto puede haber una reactivación de la corriente de Ca^{++} que despolarice el potencial de membrana cuando aún no se completó la repolarización (Clusin WT. Crit Rev Clin Lab Sci 2003). Este mecanismo es capaz de explicar la ocurrencia de arritmias en diversas condiciones clínicas, que se caracterizan por presentar un intervalo Q-T prologado en el electrocardiograma, entre las que se cuentan aquellas causadas por la mutación de

canales iónicos o las provocadas por fármacos que afectan la función de estos canales iónicos (Weiss JN. *Heart Rhythm* 2010).

Por su parte, las DADs son consecuencia de la activación de una corriente despolarizante transitoria conocida como ITi (Transient inward current), la cual es acarreada por el NCX funcionando en su modo directo (Homma N. *J Pharmacol Sci* 2006). Este fenómeno electrofisiológico desencadena arritmias por actividad gatillada en modelos de arritmogénesis asociada a sobrecarga intracelular de Ca^{++} , tales como el tratamiento con digitálicos (Kass RS. *J Physiol* 1978) o la taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas (Liu N. *Circ Res* 2006), en los que la alteración en el manejo del Ca^{++} intracelular promueve oscilaciones en el potencial de membrana mediante un mecanismo que se explica a continuación.

Va. Ondas de Ca^{++} y DADs como parte de un sustrato arritmogénico común.

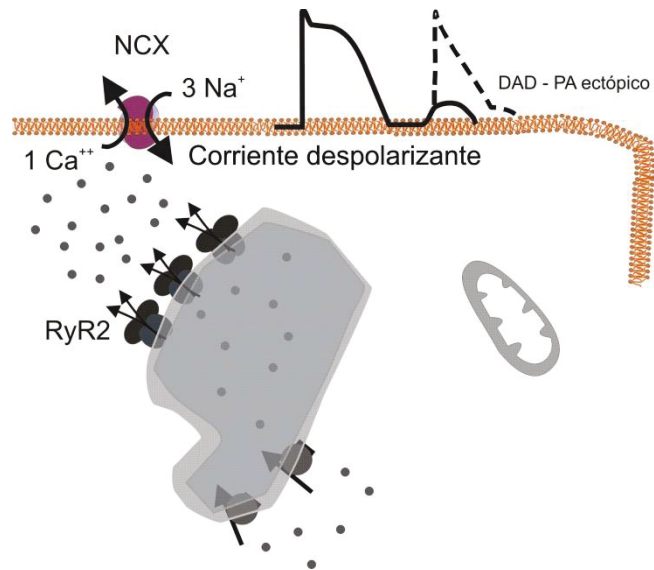
Como se describió previamente, el AEC se basa en la apertura de los RyR_2 promovida por el ingreso de Ca^{++} desde el espacio extracelular durante la meseta del PA. Este proceso depende de la relación espacial entre los canales de Ca^{++} tipo L y los RyR_2 , dado que los canales L ubicados en una díada afectan al cluster de RyR_2 adyacente promoviendo la liberación de Ca^{++} inducida por Ca^{++} (Stern MD. *Biophys J* 1992). Sin embargo, en condiciones de sobrecarga de Ca^{++} se da otro tipo de fenómeno basado en el mecanismo de liberación de Ca^{++} inducida por Ca^{++} . En este caso, la salida de Ca^{++} a través de un cluster de RyR_2 puede, al difundir hacia el espacio adyacente, activar o “reclutar” a los clusters vecinos (Keizer J. *Biophys J* 1998). De este modo, la apertura sucesiva de los RyR_2 permite la propagación de una onda de liberación lenta de Ca^{++} hacia el citosol (en inglés: “ Ca^{++} wave”) (Weiss JN. *Circ Res* 2011).

Un gran avance en el conocimiento de este proceso proviene del monitoreo de Ca^{++} citosólico con indicadores fluorescentes, realizado mediante microscopía confocal. Esta técnica ha permitido visualizar a las chispas de Ca^{++} como iniciadoras del mecanismo de “reclutamiento” que explica el origen y la propagación de ondas de Ca^{++} a nivel celular (Cheng H. *Am J Physiol* 1996).

Una vez que los iones Ca^{++} se encuentran en el citosol y tal como ocurre luego de su liberación masiva en sístole, estos podrán tomar 2 vías: el secuestro hacia el RS mediado por SERCA o la extrusión mediada por el NCX. Como puede observarse en la figura 6, la extrusión de Ca^{++} mediada por el NCX al ser un mecanismo electrogénico (ingresan 3 Na^+ por cada ión Ca^{++}), genera una despolarización que cuando ocurre luego de repolarizado el

potencial de membrana se considera una DAD. Estas DADs en caso de superar el umbral de apertura masiva de los canales de Na^+ activados por voltaje podrán disparar un PA (Schlotthauer K. *Circ Res* 2000), el cual siendo originado en un miocito ventricular se considera ectópico y además prematuro, dado que precede al PA subsiguiente que llegará por el sistema de conducción.

Figura 6: Mecanismo generador de DADs: la fuga diastólica de Ca^{++} desde el RS promueve el intercambio electrogénico de $3\text{Na}^+/1\text{Ca}^{++}$ (NCX en modo directo), capaz de despolarizar el potencial de membrana en la fase de repolarización tardía (DAD).



Tal como se mencionó previamente, cuando los cardiomiocitos se encuentran “sobrecargados” de Ca^{++} (término utilizado corrientemente para designar a un ciclado de Ca^{++} intracelular que cursa con aumento en el contenido de Ca^{++} dentro del RS), aumenta la probabilidad de que ocurran liberaciones espontáneas de Ca^{++} durante el período diastólico (u ondas de Ca^{++}).

Ya entre los años 1973 y 1978, distintos grupos demostraron que el mecanismo arritmogénico asociado al tratamiento con digitálicos depende de la generación de oscilaciones en el potencial de membrana ocurridas durante la fase de repolarización tardía del PA, que en ese momento fueron llamadas “Despolarizaciones Transitorias” (T sien RW. *Ann NY Acad Sci* 1978; Rosen MR. *Circulation* 1973; Lederer WJ. *J Physiol* 1976). Estas son un fenómeno electrofisiológico activado por la descarga intracelular de Ca^{++} (Kass RS *J Physiol* 1978), que posteriormente adquirieron el nombre de post-despolarizaciones tardías o DADs.

A nivel experimental la secuencia de eventos puede ser seguida mediante distintas técnicas que van desde: microscopía de fluorescencia, que permite evidenciar la liberación espontánea de Ca^{++} hacia el citosol; registro continuo de acortamiento, que detecta la contracción espontánea, o mediante técnicas electrofisiológicas (Patch clamp) que

detecte la despolarización del potencial de membrana o DAD dependiente de la extrusión del Ca^{++} citosólico a través del NCX (Tsien RW. Ann N Y Acad Sci. 1978).

Finalmente, es importante tener en cuenta que las DADs no son el único mecanismo arritmogénico que puede ser desencadenado por ondas de Ca^{++} , ya que se ha demostrado que si una onda de Ca^{++} ocurre durante la meseta del potencial de acción, la despolarización generada por la extrusión de Ca^{++} a través del NCX prolongará la duración del PA al oponerse a las corrientes repolarizantes. De esta forma, la ocurrencia de ondas de Ca^{++} en los cardiomiocitos es capaz de generar EADs a nivel celular, y dispersión de la refractariedad a nivel tisular (al generar diferencias en la duración de los potenciales de acción) (Xie LH. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009).

VI. Proteína Quinasa dependiente de Calcio y Calmodulina tipo II (CaMKII).

VI.a. Generalidades sobre la CaMKII.

En distintos tipos celulares existen proteínas quinasas susceptibles de ser activadas por su unión al complejo Ca^{++} /Calmodulina, lo cual les permite regular distintos procesos celulares. Entre ellas han sido descritas CaMKI, CaMKIV y CaMKII (Schulman H. Proc Natl Acad Sci U S A 1978).

CaMKII es una quinasa capaz de fosforilar a sus proteínas blanco en residuos aminoacídicos de Serina o Treonina de la que pueden encontrarse 4 isoformas codificadas por genes separados (α , β , γ y δ) (Braun AP. Annu Rev Physiol 2005). Las isoformas α y β predominan en tejido nervioso, en donde participan en procesos de aprendizaje y memoria (Giese KP. Science 1998) y las isoformas γ y δ se expresan en el resto de los tejidos (Schulman H. Proc Natl Acad Sci USA 1978).

En el músculo cardíaco predomina la isoforma δ , en dos variantes de empalme: CaMKII δ_C (citosólica) y CaMKII δ_B (nuclear) (Edman CF. Biochim Biophys Acta 1994), que se diferencian por la presencia de una secuencia de localización nuclear en CaMKII δ_B . Sin embargo, a pesar de que la expresión de CaMKII δ_C se encuentra concentrada en el citosol y la de CaMKII δ_B en fracción nuclear; ambas variantes están presentes en el citosol, la membrana plasmática y el núcleo (Mishra S. Circ Res 2011). De todos modos, la movilización de Ca^{++} en cada compartimento se asocia con efectos derivados de la activación de la variante mayormente expresada en ese compartimento. La activación de CaMKII δ_B media la fosforilación de proteínas que regulan la expresión génica, y es capaz de promover

hipertrofia cardíaca (Zhang T. J Biol Chem 2002); en cambio la activación de CaMKII δ c promueve la fosforilación de proteínas involucradas en el manejo del Ca⁺⁺ intracelular, y su sobreactivación crónica conduce a disfunción contráctil, muerte celular y arritmias (Zhang T. Circ Res 2003; Vila Petroff M. Cardiovasc Res 2007; Sag CM. Circ Heart Fail 2009).

VI.b. Mecanismo de activación de CaMKII.

A diferencia de otras quinasas dependientes de Ca⁺⁺/Calmodulina que son monoméricas (como CaMKI y CaMKIV), CaMKII es una holoenzima multimérica de 6-12 subunidades que forman una estructura circular (Braun AP. Annu Rev Physiol 2005). Como puede observarse en el panel A de la figura 7, cada monómero contiene: un dominio amino terminal, con actividad catalítica; un dominio carboxilo terminal de asociación, que permite la oligomerización; y un dominio central, cuya función es regulatoria en donde se encuentra la región de unión a calmodulina parcialmente superpuesta con una región autoinhibitoria (Braun AP. Annu Rev Physiol 2005).

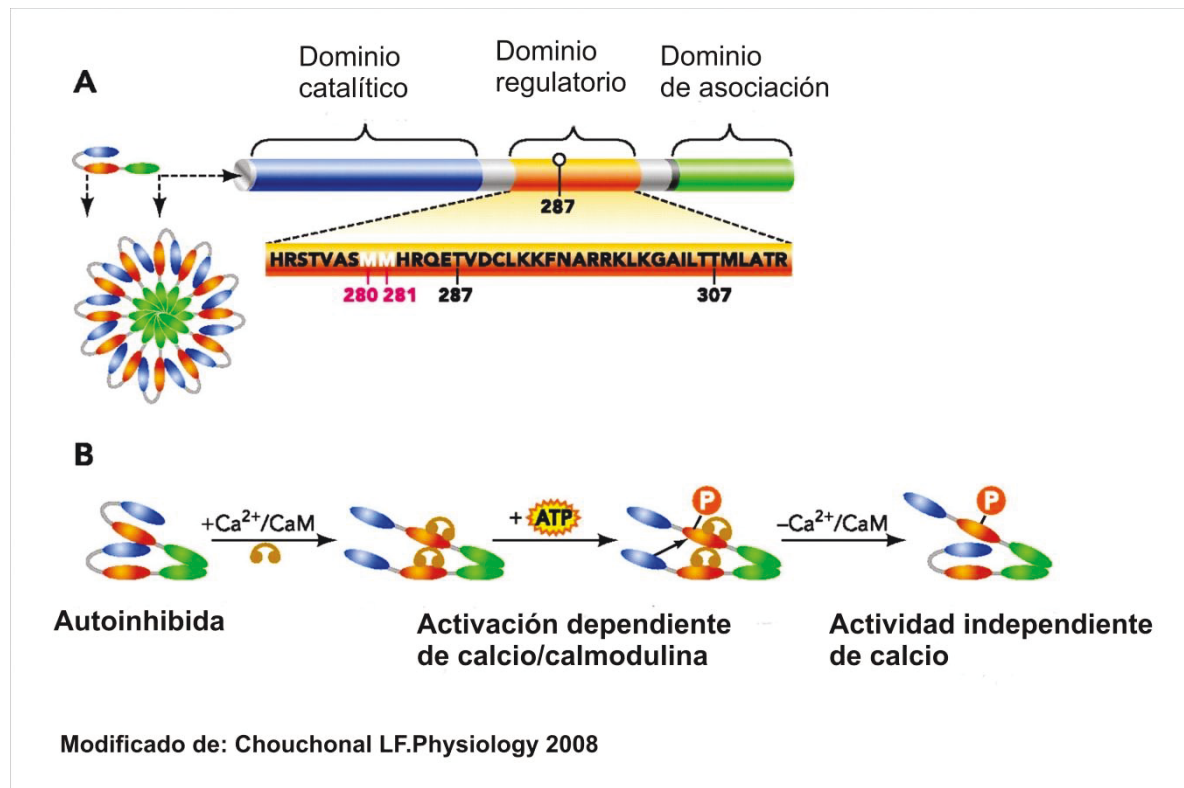


Figura 7: Representación esquemática de CaMKII que permite observar sus dominios funcionales y el mecanismo de activación dependiente del complejo Ca⁺⁺ /Calmodulina, que deriva en la autofosforilación capaz de sostener su actividad enzimática aún cuando los niveles de Ca⁺⁺ fluctúan durante el ciclo cardíaco.

Cuando la concentración intracelular de Ca^{++} ($[\text{Ca}^{++}]_i$) aumenta, la proteína calmodulina une 4 iones Ca^{++} formando el complejo Ca^{++} /Calmodulina, capaz de unirse al dominio regulatorio de CaMKII y desplazar al dominio autoinhibitorio (Maier LS. *J Mol Cell Cardiol* 2006). En el panel B de la figura 7 puede observarse como la activación dependiente de Ca^{++} /calmodulina permite la autofosforilación del residuo de treonina 287 (thr287) ubicado en el segmento autoinhibitorio (Braun AP. *Annu Rev Physiol* 2005; Zhang T. *Cardiovasc Res* 2004). Esta es en realidad una trans-fosforilación, en la que un monómero es fosforilado por otros monómeros que se encuentran activados en la misma holoenzima (Hanson P. *Neuron* 1994).

La autofosforilación permite sostener la activación de CaMKII aún cuando no persista el aumento del Ca^{++} activador (por ejemplo durante el período diastólico) y el complejo Ca^{++} /calmodulina se encuentre disociado del dominio regulatorio, este es el llamado “estado autónomo” (Hudmon A. *Annu. Rev. Biochem.* 2002). En este estado, CaMKII debe ser defosforilada para una completa inactivación, lo cual depende de la actividad de diversas proteínas con actividad fosfatasa tales como la proteína fosfatasa 1 (PP1), 2A (PP2a) y 2C (PP2C) (Zhang T. *Cardiovasc Res* 2004).

En los últimos años se ha descrito otro mecanismo capaz de regular la actividad de CaMKII, basado en la oxidación directa del residuo Metionina 281/282. Esto implica la posibilidad de que la activación de CaMKII sea facilitada por un aumento del estrés oxidativo intracelular (Erickson JR. *Cell* 2008; Palomeque J. *Circ Res* 2009).

También existen reportes recientes que proponen que la glicosilación del residuo Serina 280 (Erickson JR. *Nature* 2013), o la nitrosilación de residuos cisteína (Gutierrez D. *Cardiovasc Res* 2013) pueden activar a CaMKII, aunque aún no está determinado si estas modificaciones post-traduccionales son capaces de activar a CaMKII en ausencia de Ca^{++} o actúan como “sensibilizadores” que permiten la activación de CaMKII aún con bajas $[\text{Ca}^{++}]_{\text{citósólico}}$.

VI.c. Efecto de las fosforilaciones dependientes de CaMKII sobre las proteínas involucradas en el manejo del Ca^{++} .

CaMKII fosforila a diversos sustratos en los cardiomiocitos; incluidos canales iónicos, bombas de transporte activo, y factores de transcripción (Bers DM. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009). En las siguientes secciones se describen sus efectos sobre proteínas implicadas en forma directa en el manejo del Ca^{++} intracelular.

Fosforilación de los canales de Ca^{++} tipo L.

CaMKII puede regular el ingreso de Ca^{++} a los cardiomiocitos mediante la fosforilación de los canales de Ca^{++} tipo L, lo que aumenta el pico y retrasa la inactivación de la corriente de Ca^{++} ($\text{I}_{\text{Ca}^{++}}$), produciendo el fenómeno de “facilitación de $\text{I}_{\text{Ca}^{++}}$ dependiente de Ca^{++} ” (Xiao RP. Proc Natl Acad Sc 1994). Aunque el papel fisiológico de esta fosforilación no está completamente dilucidado, se cree que permite mitigar el efecto inhibitorio directo que ejerce el Ca^{++} sobre $\text{I}_{\text{Ca}^{++}}$ a altas frecuencias de estimulación (Yuan W. Am J Physiol 1994).

Por otro lado, esta fosforilación puede permitir la reactivación de $\text{I}_{\text{Ca}^{++}}$ durante la meseta de potenciales de acción prolongados, favoreciendo el desarrollo de EADs (Wu Y. Circulation 2002; Bers DM. Front Pharmacol 2014).

Modulación de la liberación de Ca^{++} por el RS: fosforilación de los RyR_2 .

La interacción física entre CaMKII y los RyR_2 ha sido demostrada (Wehrens XH. Circ Res 2004; Currie S. Biochem J 2004) y existen múltiples grupos de investigación que proponen que esta quinasa, al fosforilar a los RyR_2 en el residuo Ser-2814, incrementa su probabilidad de apertura y promueve la pérdida espontánea de Ca^{++} desde el RS hacia el citosol (Currie S. Biochem J 2004; Maier L. Circ Res 2003; Guo T. Circ Res 2006). Otras evidencias indican que la fosforilación de este sitio por CaMKII en la estimulación β -adrenérgica, promueve un aumento en la liberación de Ca^{++} inucida por Ca^{++} (Ferrero P. J Mol Cell Cardiol 2007). Sin embargo existe un reporte que muestra una reducción en la apertura espontánea de los RyR_2 durante el período diastólico como consecuencia de la fosforilación dependiente de CaMKII a nivel del residuo Ser-2814 (Yang D. Circ Res 2007). En cuanto a esta discordancia, consideramos importante la evidencia surgida de un trabajo reciente, en el cual los RyR_2 de ratones que expresan una variante hiperfosforilada en Ser-2814 mostraron un aumento en su probabilidad de apertura durante el registro de corrientes de canal único (van Oort. Circulation 2010).

Efectos sobre la retoma de Ca^{++} hacia el RS (fosforilación de Fosfolamban).

Tal como fue mencionado previamente, el transporte activo mediado por SERCA permite la retoma de Ca^{++} desde el citosol hacia el RS, y es afectado por la interacción SERCA-PLB que frena dicho transporte. Sin embargo, este fenómeno es reversible, dado que cuando PLB se encuentra fosforilada la interacción entre ambas proteínas es menos estable.

PLB puede ser fosforilada en el residuo Serina 16 por la PKA o en en el residuo Treonina 17 por CaMKII (Lindenmann. J Biol Chem 1985; Mundina-Weilenmann C. J Biol Chem 1996), y estas fosforilaciones median el incremento en la velocidad de relajación que ocurre durante la estimulación β -adrenérgica (Lindenmann. J Biol Chem 1985; Mundina-Weilenmann C. J Biol Chem 1994; Vittone L. Am J Physiol 1990; Said M. Pflügers Archiv 2003). De esta forma, la fosforilación de PLB por CaMKII afecta la velocidad de secuestro de Ca^{++} y el contenido de Ca^{++} del RS (Brittsan AG. J Mol Cell Cardiol 2000).

Adicionalmente, CaMKII es capaz de fosforilar poblaciones determinadas de canales de Na^+ y K^+ (Bers DM. J Cardiovasc Pharmacol 2009), el intercambiador Na^+-H^+ (Vila-Petroff M. J Mol Cell Cardiol 2010) y proteínas sarcoméricas como la titina (Hidalgo C. J Mol Cell Cardiol 2013) por lo cual la actividad de esta quinasa se encuentra involucrada en la regulación de múltiples parámetros fisiológicos y en diversos mecanismos fisiopatológicos.

Hipótesis de trabajo

Clásicamente, tanto el efecto inotrópico como el efecto arritmogénico provocados por la inhibición de la NKA con digitálicos, han sido atribuidos a la sobrecarga de Ca^{++} dentro del RS (Bers DM. Kluwer Academic Publishers 2001). Sin embargo, existen modelos en los que un aumento en el contenido de Ca^{++} del RS no es suficiente para promover arritmias. Por ejemplo, los ratones transgénicos que no expresan la proteína Fosfolamban (PLB-KO) no desarrollan un fenotipo arritmogénico en reposo a pesar de tener aumentado el contenido de Ca^{++} en el RS (Santana LF. J Physiol 1997).

En la última década, han surgido numerosos trabajos que establecen una fuerte relación entre la activación de CaMKII y la generación arritmias en diversos modelos (Sag CM. Circ Heart Fail 2009; Said M. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008; Erickson JR. Nature. 2013). Paralelamente, nuestro grupo de trabajo ha detectado un incremento en la autofosforilación de CaMKII en cardiomiocitos cultivados durante 24 horas en presencia de concentraciones sub-arritmogénicas de ouabaína (Sapia L. J Mol Cell Cardiol 2010).

Basados en la evidencia disponible, hipotetizamos que la exposición aguda de los cardiomiocitos a dosis elevadas de digitálicos promueve la activación de CaMKII, incrementando la fosforilación de proteínas involucradas en el manejo del Ca^{++} y activando el desarrollo de un perfil arritmogénico en dichas células.

Objetivos

1. Determinar si el tratamiento agudo con dosis arritmogénicas de digitálicos es capaz de promover la activación de CaMKII y evaluar si la actividad de esta quinasa es mediadora de alteraciones arritmogénicas en el manejo del Ca^{++} durante dicho tratamiento.
2. Determinar la importancia que la actividad de CaMKII pueda tener en el desarrollo de una respuesta inotrópica positiva durante el tratamiento con glucósidos cardiotónicos.
3. Evaluar la importancia que pueda tener la activación de CaMKII en la génesis de arritmias en un modelo de intoxicación digitálica *In Vivo*.
4. Discriminar el rol que pueda cumplir la fosforilación de los RyR_2 y de Fosfolamban en modelos celulares de intoxicación digitálica.
5. A partir de los resultados obtenidos, evaluar posibles estrategias antiarrítmicas basadas en la inhibición de la actividad de CaMKII o en la intervención sobre el mecanismo arritmogénico desencadenado por los digitálicos.

Materiales y Métodos

I. Aspectos generales

Todos los experimentos han sido realizados de acuerdo a las normas generales para el cuidado y uso de animales de laboratorio, estipuladas en la "Guide for the care and use of laboratory animals, NIH publication nº 85-23, 1996".

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (200-300 gramos) y distintas cepas de ratón que serán detalladas en las secciones correspondientes.

Gran parte de los experimentos fueron realizados utilizando cardiomiocitos ventriculares aislados, que fueron obtenidos mediante la técnica de digestión enzimática con colagenasa tal como se describe a continuación.

II. Aislamiento de miocitos cardíacos: Técnica de digestión enzimática en sistema de perfusión tipo Langendorff.

Para extraer el corazón, los animales son anestesiados con Pentobarbital Sódico (35mg/Kg) por vía intraperitoneal y se espera hasta alcanzar una correcta anestesia y analgesia, que son comprobadas al determinar ausencia de reflejo tendinoso y corneal, como así también la ausencia de respuesta frente a estímulos dolorosos.

El acceso al corazón se logra realizando una toracotomía, mediante una incisión a la altura del esternón, que deja expuesta la totalidad de la cavidad torácica. Posteriormente, se retira la cubierta pericárdica y se procede a inyectar 1 ml de heparina sódica (200U/ml) dentro de la cavidad ventricular para evitar la formación de coágulos. Finalmente, el corazón es removido y suspendido en un sistema de perfusión tipo Langendorff mediante canulación de la aorta.

En este sistema comienza la perfusión retrógrada con solución HEPES (1 mM $\text{Cl}_2\text{Ca}^{++}$) burbujeada con O_2 al 100 % para limpiar el tejido y estabilizar la función contráctil. Luego el corazón es perfundido durante 5 minutos con una solución nominalmente libre de calcio que contiene 0.1 mM de EGTA (compuesto capaz de unirse al Ca^{++} libre), con lo cual el corazón deja de latir y se debilitan las uniones intercelulares (Vila Petroff M. Aislamiento de Miocitos. En: Introducción al Análisis Científico del Aparato Cardiovascular en Bioingeniería 2004)

El siguiente paso consiste en recircular, durante 15 minutos, una solución de digestión compuesta por: 0.5 mM $\text{Cl}_2\text{Ca}^{++}$, 0.50 mg/ml de colagenasa tipo II (300U/ml), 0.02mg/ml de proteasa y albúmina bovina 0.5 mg/ml. El proceso de digestión transcurre a 37 Cº, y en su etapa final se puede observar la menor consistencia del corazón al tacto.

Una vez concluida la digestión, el corazón es desmontado y el tejido ventricular no digerido es disociado mecánicamente con tijeras. De esta forma se obtiene una suspensión de células que atraviesan 4 pasos de decantación y resuspensión en soluciones cada vez más concentradas de $\text{Cl}_2\text{Ca}^{++}$, hasta lograr una concentración final de 1 mM que se utilizará en los posteriores experimentos. Este pasaje escalonado por soluciones progresivamente más concentradas en $\text{Cl}_2\text{Ca}^{++}$ tiene como finalidad evitar la muerte celular por recalcificación rápida. Finalmente, las células aisladas son conservadas en buffer Hepes a 20-24 C°, donde se mantienen en suspensión hasta su utilización dentro de las siguientes 6 horas (Vila Petroff M. J Physiol 2000). El criterio considerado para utilizar o descartar a determinada célula, al comienzo de un experimento, está basado en la comprobación de sus características morfológicas (indicadas en la figura 7) y su capacidad para contraerse ante la estimulación eléctrica.

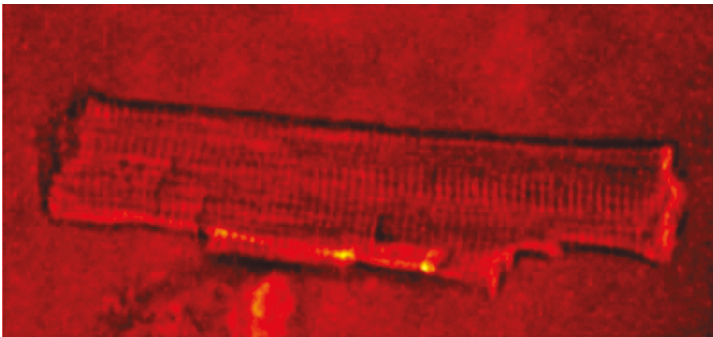


Figura 7: Cardiomiocito ventricular de rata, iluminado con luz transmitida, en el que se puede observar un patrón sarcomérico conservado y bordes regulares.

Solución amortiguadora Hepes (en mMoles/litro. Ajustada a pH 7.4 con HONa):

ClNa 146.2

ClK 4.7

$\text{Cl}_2\text{Ca}^{++}$ 1

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

PO_4NaH_2 0.35

SO_4Mg 1.05

Glucosa 10

III. Registro de Ca^{++} citosólico y acortamiento celular.

Con el propósito de monitorear en tiempo real las características del ciclado de Ca^{++} citosólico, se realizaron experimentos funcionales mediante microscopía de epifluorescencia en cardiomiocitos aislados. Las células fueron incubadas durante 12 minutos a temperatura ambiente con el indicador sensible a Ca^{++} Fura-2, en una concentración de $10 \mu\text{M}$.

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 del indicador internalizadas dentro de las células. Luego del período de incubación las células se centrifugaron a baja velocidad durante 1 minuto y se resuspendieron en solución Hepes libre de indicador, para descartar a aquellas moléculas de indicador que no ingresaron al compartimento intracelular.

El Fura-2 se utiliza en su forma permeante éster de acetoximetilo (AM), que se comporta 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 queda retenida en el interior celular. Por esta razón, las células no fueron utilizadas hasta luego de transcurridos 30 minutos posteriores a la incubación con el indicador, para permitir la desesterificación intracelular del mismo y trabajar con células que contengan una concentración intracelular estable de Fura-2 (Vila Petroff M. Calcio-pH-Sodio Intracelular. En: Introducción al Análisis Científico del Aparato Cardiovascular en Bioingeniería 2004).

Las células ya cargadas fueron colocadas sobre la platina de un microscopio invertido Nikon Diaphot 200) adaptado para la técnica de epifluorescencia tal como lo indica la figura 8. 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 que supere en un 20% el umbral de activación de los miocitos. Estos estímulos eléctricos son enviados a través de dos electrodos de platino, colocados a cada lado de la cámara de perfusión a una frecuencia de 0.5 Hertz (Hz).

Para obtener una señal fluorescente sensible Ca^{++} citosólico la muestra fue iluminada 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 $>510 \text{ nm}$ y amplificada 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 la emisión varía según se encuentre o no interactuando con moléculas de Ca^{++}) y la señal emitida cuando es excitado con luz de 380 nm de longitud de onda (en esta condición la intensidad de señal emitida es independiente de la interacción entre moléculas de fluoróforo y Ca^{++}). 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.

Con el propósito de generar contraste óptico entre los bordes celulares y el fondo de la cámara de perfusión, la célula a estudiar es iluminada con luz roja (640-750 nm) a través de un sistema óptico para luz visible. De esta forma se logra la videodetección de bordes celulares, lo que permite registrar la longitud y monitorear el acortamiento de los cardiomiocitos. Los datos adquiridos son almacenados en un software adecuado (ION Optix análisis) para su posterior análisis.

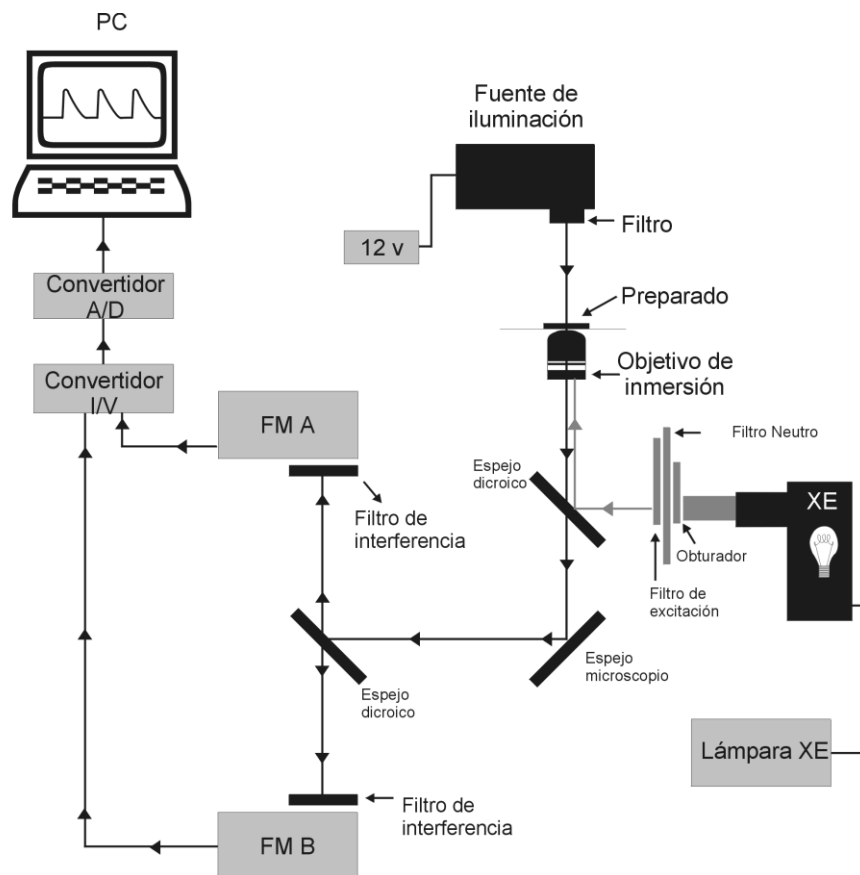


Figura 8: Esquema que muestra los componentes elementales del sistema de microscopía adaptado para experimentos de fluorescencia. Convertidor A/D: analógico-digital; convertidor I/V: intensidad-voltaje; FM A y B: Fotomultiplicadores; XE: Xenón.

En conjunto, la posibilidad de medir acortamiento celular y Ca^{++} citosólico se utiliza para evaluar en tiempo real el estado inotrópico de las células en condiciones basales y los cambios acontecidos en respuesta a los diferentes tratamientos.

Luego de haber evaluado la respuesta inotrópica estimulando a los cardiomiocitos a 0.5 Hz, en los últimos 10 minutos de protocolo experimental se retiró el marcapaseo eléctrico con el objetivo de contabilizar la frecuencia de liberaciones espontáneas de Ca^{++} y su correlato contráctil. Este fenómeno en su conjunto es interpretado como índice de actividad intracelular pro-arritmogénica (Xie LH. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009).

Estimación del contenido luminal de Ca^{++} en el RS

La cantidad total de Ca^{++} contenida dentro del RS de un cardiomiocito (“SR calcium load”), es estimada a partir de la amplitud del aumento de fluorescencia emitida por el Fura-2 luego de la aplicación de un pulso de cafeína. Esta maniobra consiste en la aplicación rápida de cafeína 15 mM, que provoca la liberación completa de las moléculas de Ca^{++} contenidas dentro del RS (Bers DM. Kluwer Academic Publishers 2001).

IV. Estudio de la liberación de Ca^{++} discriminada regionalmente mediante microscopía confocal.

Para el estudio en tiempo real de la liberación espontánea de Ca^{++} , que permita paralelamente la discriminación regional a lo largo de la célula, se trabajó en microscopía confocal con cardiomiocitos de rata cargados con el indicador sensible a Ca^{++} Fluo-3. Dicha carga se realiza incubando a las células con 10 μM de Fluo-3 durante 10 minutos en oscuridad, previo a la realización de los experimentos.

Para lograr la obtención de señal fluorescente sensible a Ca^{++} citosólico, aquella célula seleccionada es excitada con luz de 488 nm proveniente de un láser Argón y la señal emitida es recolectada en el rango de 510 a 560 nm. En estos experimentos se realiza el barrido longitudinal de la célula en un plano focal específico (tanto el sector a barrer como el plano focal son seleccionados antes de comenzar cada experimento, buscando obtener una buena relación célula/fondo y evitando atravesar los núcleos celulares). A diferencia de la información obtenida en experimentos realizados en epifluorescencia, el barrido lineal realizado en un plano focal específico, permite obtener resolución espacial de la liberación de Ca^{++} dentro de la célula evaluada. Como se puede observar en la representación tridimensional presentada en la figura 9, esta técnica permite detectar

eventos de liberación local y transitoria de Ca^{++} , conocidos como “chispas de Ca^{++} ” (en inglés: Ca^{++} sparks) sin dejar de detectar la ocurrencia de ondas de Ca^{++} (en inglés: Ca^{++} waves).

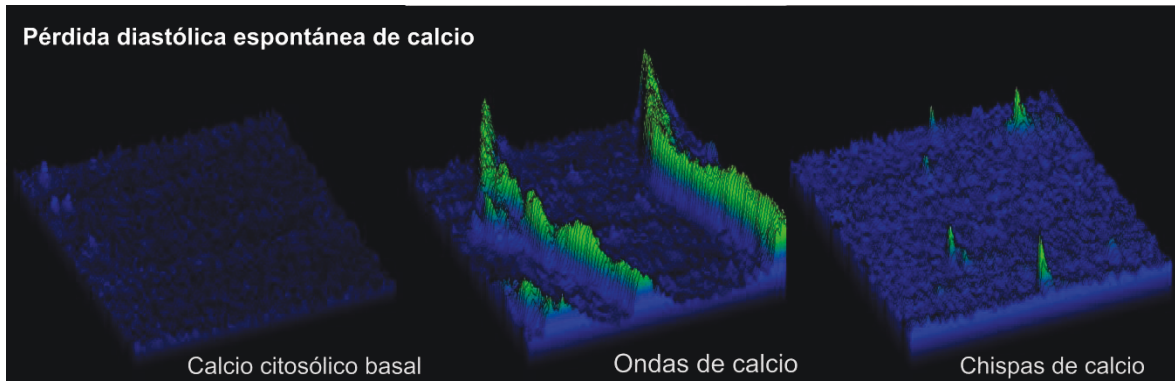


Figura 9: Reconstrucción tridimensional de registros de fluorescencia adquiridos mediante el barrido lineal realizado por microscopía confocal en miocitos cardíacos de rata incubados con el indicador Fluo-3. La señal emitida es sensible a Ca^{++} citosólico y permite observar la ocurrencia de ondas y chispas de Ca^{++} .

El análisis de las imágenes obtenidas se realizó con el complemento *Sparkmaster* del programa de análisis de imágenes *Image J*. Dicho complemento ha sido diseñado y validado para el estudio de la frecuencia y características individuales de las chispas y ondas de Ca^{++} (Picht E. Am J Physiol Cell Physiol 2007), y puede descargarse gratuitamente ingresando al artículo citado.

V. Inmunodetección por Western Blot.

Los homogenatos, fracciones citosólicas y membranas del RS fueron obtenidas a partir de tejido ventricular pulverizado, proveniente de corazones de ratas wistar que luego de ser sometidos al correspondiente protocolo experimental en un sistema de perfusión tipo langendorff fueron congelados en nitrógeno líquido.

La cantidad de proteína fue medida por el método de Bradford usando albúmina sérica bovina como proteína estándar para la curva de calibración. Los lisados (~90 μg de proteína por línea de corrida del gel) fueron sembrados en un gel de poliacrilamida con SDS al 10% y transferidas a membranas de polyvinylidene difluoride. Los blots fueron incubados durante la noche con anticuerpos específicos contra Fosfolamban (PLB) (ABR, California, Estados Unidos), fosfo-treonina17-PLB (Badrilla, Leeds, Reino Unido), CaMKII (Chemicon international, Lake placid, NY), fosfo-Treonina286-CaMKII (Badrilla, Leeds, UK),

fosfo-Serina 2814 RyR (Badrilla, Leeds, UK) y anti GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Estados Unidos). Luego de la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas fueron lavadas con TBS-T y luego incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a Peroxidasa. La inmuno-reactividad fue visualizada mediante un Kit de detección basado en la quimioluminiscencia inducida por Peroxidasa, (Amersham Biosciences) utilizando el sistema de adquisición de imágenes Chemidoc. Se obtuvieron así, bandas de diferente intensidad y tamaño de acuerdo a la cantidad de antígeno detectado (Vila Petroff M. *Cardiovasc Res* 2007), cuya fue cuantificada por densitometría utilizando el programa de análisis de imágenes Image J (NIH, Estados Unidos).

VI. Cultivo primario y transfección de miocitos cardíacos de rata.

Con el objetivo de sobreexpresar CaMKII, se utilizaron adenovirus recombinantes de tipo 5 para transducir miocitos cardíacos de rata, que fueron incubados durante 24 horas con una multiplicidad de infección (MOI) de 100. Los adenovirus fueron gentilmente provistos por el Dr Roger J. Hajjar (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY). Como control negativo, se utilizó el mismo constructo adenoviral, conteniendo el gen de β -galactosidasa en lugar del gen de CaMKII. Además, los adenovirus expresan la proteína fluorescente verde (GFP) como reportero de la transducción; estando la expresión proteica bajo el promotor fuerte de citomegalovirus (CMV). La magnitud de expresión de CaMKII se comprobó mediante la inmunodetección por western blot.

Para el cultivo primario de miocitos cardíacos de rata, las células obtenidas por el método de digestión enzimática fueron resuspendidas en el medio DMEM. Este medio de cultivo contiene (en gramos/litro) 0.017 de ácido ascórbico, 0.4 de L-Carnitina, 0.66 de Creatina, 0.62 de Taurina, además de 50 unidades/ml de Penicilina y 50 unidades/ml de Estreptomina.

Luego los cardiomiocitos fueron sembrados dentro de discos de cultivo por una hora, con una densidad de $\sim 2 \times 10^4$ células/ml, este paso permite que las células queden adheridas a la base del disco de cultivo. Al finalizar este período, el medio de cultivo fue recambiado y se adicionaron las partículas virales.

Luego de 24 horas de cultivo, las células fueron fotografiadas en un microscopio de epi-fluorescencia (excitando a las células con una longitud de onda de 480 nm) para poder corroborar la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) que se utilizó como marcador de la eficacia de transfección viral, dado que es co-expresada con los genes de interés. Finalmente, luego de comprobada la expresión de proteínas codificadas por el adenovector, las células fueron cuidadosamente colectadas para la realización de experimentos funcionales.

VII. Registro electrocardiográfico en ratones.

Se realizó el registro electrocardiográfico de superficie en la derivación D1, utilizando electrodos estándar y el sistema de adquisición de datos Power Lab 4ST. Estos registros se tomaron en ratones BALB-C y SR-AIP (Ver descripción de cepas más adelante), tratados con 10 mg/kg de ouabaína administrada en forma intraperitoneal (IP). Un subgrupo de ratones BALB-C fue tratado con 30 $\mu\text{mol/kg}$ del inhibidor de CaMKII, KN-93, aplicado por vía IP. Esta dosis ha sido utilizada previamente para inhibir la actividad de CaMKII en tratamientos *In vivo* (Sag CM. Circ Heart Fail 2009; Liu N. J Mol Cell Cardiol 2011).

El tratamiento con KN-93 fue administrado en 2 aplicaciones, de las cuales la primera se realizó 5 minutos antes de inyectar ouabaína, mientras que la segunda fue aplicada conjuntamente con la ouabaína. Los registros fueron analizados durante un período de 60 minutos luego de 20 minutos de administrada la ouabaína, trabajando con una velocidad de adquisición de 40 KHz.

Para evitar la inmovilización de los ratones durante el protocolo experimental y lograr la obtención de registros en condiciones fisiológicas, diseñamos un sistema de aplicación de los electrodos en el cual estos están adaptados a un chaleco de paño ajustable por Velcro. Como se puede observar en la figura 10, este dispositivo permite la libre movilidad de los animales dentro de la caja contenedora. Los ratones fueron previamente adaptados a la utilización del chaleco en las 24 horas previas a la realización del experimento.



Figura 10: Registro electrocardiográfico realizado mediante la colocación de electrodos en un chaleco de paño diseñado para permitir la movilidad de los ratones durante el transcurso del experimento. Este chaleco se ajusta y fija mediante un sistema de cierre tipo abrojo o “Velcro”.

VIII. Análisis estadístico.

Los resultados promedio se expresan como la media \pm error estándar. Para estudios de significación estadística se utilizó el test de Student en caso de dos muestras, y el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el post test de Newman-Keuls. El procesamiento estadístico de los datos obtenidos durante el registro electrocardiográfico *In Vivo* se realizó mediante el Test de Fisher. En todos los casos se consideró $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

IX. Cepas de ratones transgénicos utilizadas.

Para la realización de determinados experimentos que forman parte de esta tesis fueron utilizadas 2 cepas de ratones transgénicos que se presentan a continuación:

Ratones SR-AIP: Estos ratones contienen cuatro copias de la secuencia de ADN que codifican la secuencia de 13 aminoácidos que componen al péptido inhibidor específico para CaMKII llamado Autocamtide-2-related-peptide (AIP), unido a una secuencia de anclaje al RS (Ji Y. *J. Biol. Chem* 2003). Esta cepa es mantenida en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, en el marco de una colaboración con el Doctor John Deedman-University of Cincinnati, OH.

Ratones PLB-DM: Estos ratones expresan una variante de la proteína fosfolamban en la que los residuos fosforilables Ser-16 y Thr-17 se encuentran reemplazados por el aminoácido Alanina. De este modo la proteína deja de ser un blanco fosforilable de PKA y CaMKII (Brittsan AG. *J Biol Chem* 2000, Brittsan AG. *Circ Res.* 2003). Esta cepa es mantenida en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, en el marco de una colaboración con la Dra. Evangelia G. Kranias (University of Cincinnati, OH).

X. Inhibición farmacológica de CaMKII.

El inhibidor más utilizado hasta el momento para el estudio de las funciones de CaMKII ha sido el KN-93, cuyo mecanismo inhibitorio se basa en competir con el complejo Ca^{++} /Calmodulina e impedir la activación de CaMKII (Pellicena P. *Front Pharmacol* 2014). También impide la activación inducida por oxidación o glicosilación, sin embargo, no es capaz de inhibir la actividad catalítica de la holoenzima ya autofosforilada. Una estrategia útil para descartar posibles efectos inespecíficos del KN-93 consiste en utilizar KN-92, una molécula análoga incapaz de inhibir la activación de CaMKII.

Por otro lado, existen inhibidores basados en el sustrato, que compiten con el segmento de autofosforilación. Estos son pequeños péptidos, como el Autocamtide-2-related inhibitory peptide (AIP), que son capaces de inhibir la actividad catalítica de la quinasa aún cuando esta se encuentre en estado autónomo y no poseen efectos inespecíficos sobre canales iónicos (Pellicena P. Front Pharmacol 2014).

Resultados

I. El tratamiento agudo con ouabaína en dosis arritmogénicas aumenta la contractilidad y la frecuencia de contracciones espontáneas en cardiomiocitos ventriculares de rata.

Los roedores son resistentes al efecto de los digitálicos, por esta razón las concentraciones terapéuticas/tóxicas de estos compuestos son más de 100 veces mayores en roedores que en humanos (Gupta RS. J Cell Physiol 1986). La concentración de ouabaína en los experimentos que se describen a continuación (50 $\mu\text{mol/litro}$) ha demostrado previamente ser arritmogénica (Lotan CS. J Mol Cell Cardiol 1992), sin sobrepasar innecesariamente el límite de toxicidad descrito en roedores (Gupta RS. J Cell Physiol 1986).

Para poder evaluar los efectos agudos que el tratamiento con ouabaína promueve sobre la función contráctil y el manejo de Ca^{++} intracelular, registramos la amplitud de acortamiento celular y la luz emitida por el indicador fluorescente sensible a Ca^{++} Fura-2, en cardiomiocitos ventriculares de rata marcapaseados a 0.5 HZ durante 35 minutos.

Luego de 5 minutos de estabilización de la función contráctil mediante la circulación continua (a partir de aquí “perfusión”) de una solución Hepes, se pasó a una perfusión con solución Hepes + ouabaína 50 μM durante 20 minutos. Luego de este período se retiró el marcapaseo eléctrico para proseguir durante 10 minutos con el registro de longitud celular y fluorescencia sensible a Ca^{++} citosólico. Este protocolo permitió evaluar en cada célula la frecuencia de contracciones espontáneas, luego de haber registrado la respuesta inotrópica al tratamiento con ouabaína.

Las contracciones espontáneas (CE) se deben a la salida espontánea de Ca^{++} desde el RS, por lo que para referirnos en conjunto al registro del aumento de Ca^{++} por fluorescencia y su correlato contráctil utilizaremos el término “evento espontáneo” (EE). Este fenómeno será contabilizado como indicador de actividad arritmogénica a nivel celular.

Como grupo control se utilizaron miocitos ventriculares, que fueron perfundidos en solución Hepes y marcapaseados a 0.5 hz durante 20 minutos, seguidos de 10 minutos sin marcapaseo eléctrico. En la figura 11A puede observarse un trazo representativo del registro continuo de acortamiento celular y $[\text{Ca}^{++}]$ citosólico que demuestra la estabilidad de ambos parámetros en un cardiomiocito control. Posteriormente, se observa el comportamiento de esta célula durante 10 minutos sin marcapaseo eléctrico, evidenciándose 11 EE en este período.

En cambio, en la figura 11B se puede observar que la célula tratada con ouabaína desarrolla un incremento en la amplitud de sus transitorios de Ca^{++} y contracciones. La misma manifestó luego una tendencia a la descarga espontánea de Ca^{++} , que puede evidenciarse por la ocurrencia de 50 EE durante los 10 minutos finales del protocolo experimental en los que la célula permaneció perfundida sin marcapaseo eléctrico.

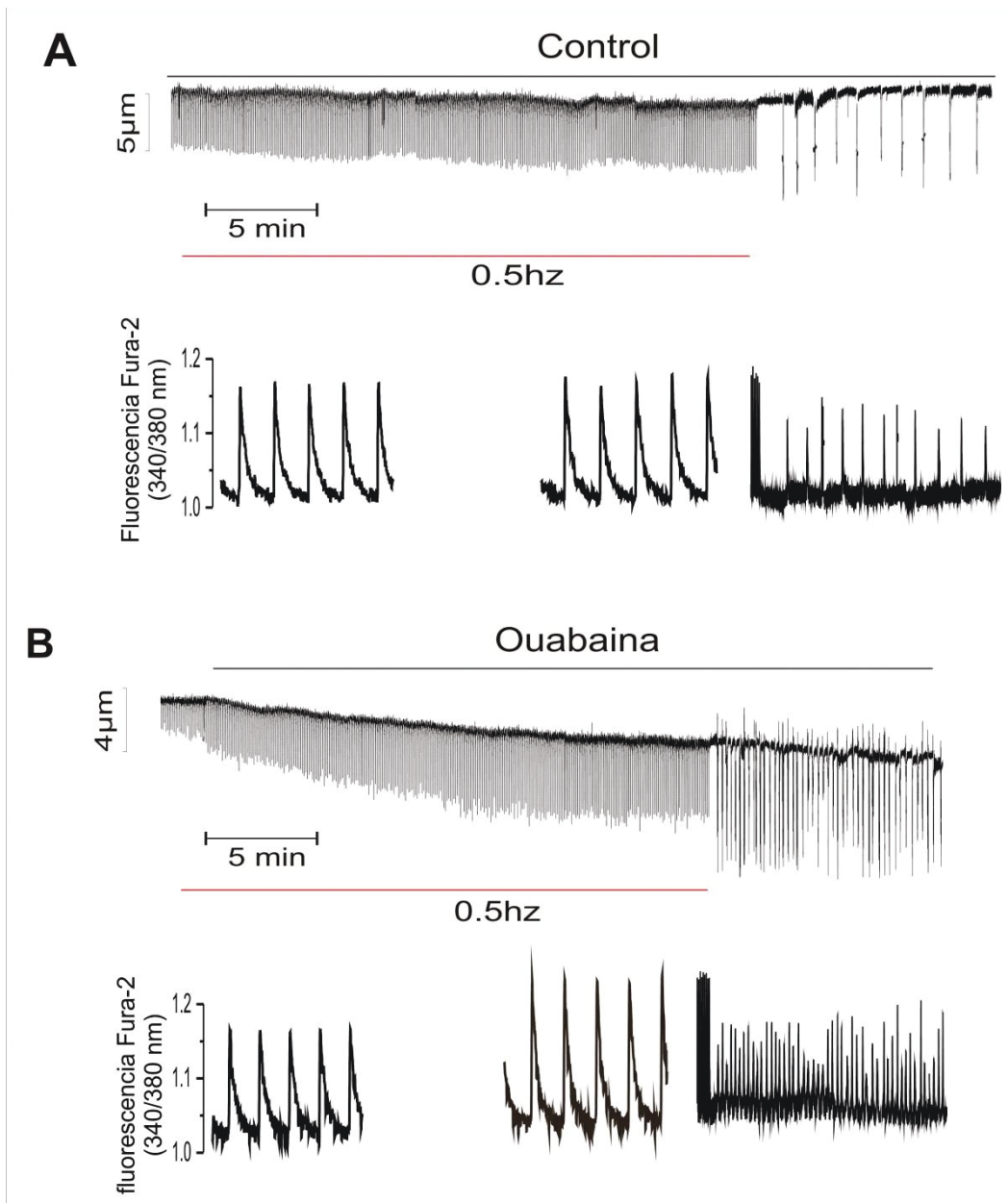
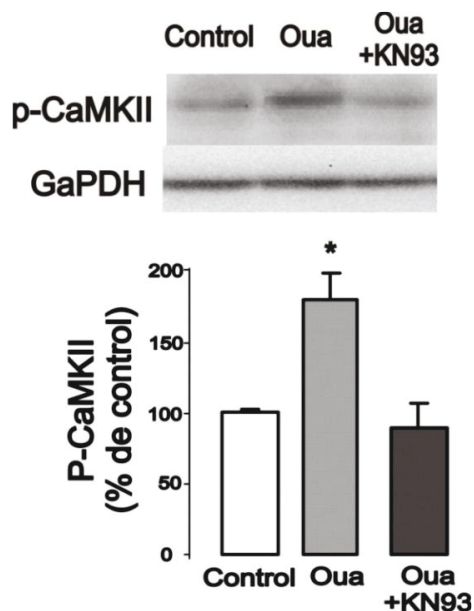


Figura 11: Trazos representativos del registro simultáneo de acortamiento celular y Ca^{++} citosólico. Control= Hepes Ca^{++} 1 mM; ouabaína= Hepes Ca^{++} 1 mM + ouabaína 50 μM .

II. El tratamiento agudo con ouabaína en dosis arritmogénicas activa a CaMKII en miocitos cardíacos de rata.

Para evaluar si el tratamiento agudo con dosis arritmogénicas de ouabaína es capaz de activar a CaMKII; corazones perfundidos mediante la técnica de Langendorff fueron tratados durante 20 minutos con ouabaína 50 μM . Las muestras obtenidas fueron procesadas para el estudio de fosforilación por western blot, utilizando un anticuerpo capaz de reconocer la fosforilación del residuo Treonina 287 de CaMKII (p-CaMKII) que fue utilizada como índice de activación de la quinasa ya que refleja la trans-fosforilación entre monómeros de la holoenzima (Hanson P. *Neuron* 1994). Como puede observarse en la figura 12 el tratamiento agudo con ouabaína 50 μM produjo un aumento significativo en la actividad de CaMKII.

La especificidad de esta trans-fosforilación ocurrida entre subunidades de CaMKII puede comprobarse al observar que las muestra tratadas con ouabaína, en presencia de un inhibidor farmacológico de CaMKII (KN-93 2,5 μM), no presentaron un incremento significativo en la detección de pCaMKII. Como ya se describió, el KN-93 es la molécula más estudiada como inhibidor de CaMKII, y su efecto farmacológico se debe a su capacidad de interferir en la interacción entre CaMKII y el complejo Ca^{++} /Calmodulina (Pellicena P. *Front. Pharmacol* 2014).



Control: corazones perfundidos con solución Hepes durante 20 minutos (**n=5**).

Oua: corazones perfundidos durante 20 minutos con solución Hepes+ ouabaína 50 μM (**n=5**).

Oua+KN-93: corazones perfundidos con solución Hepes + KN-93 2.5 μM durante 5 minutos, y luego con Hepes+ouabaína+KN-93 durante 20 minutos (**n=5**).

Figura 12: Blots representativos y resultados promedio que muestran el efecto promovido por el tratamiento con ouabaína 50 μM sobre la autofosforilación de CaMKII, tanto en presencia como en ausencia de Kn-93 2.5 μM . * Indica $p < 0.05$.

III. La inhibición farmacológica de CaMKII reduce el efecto arritmogénico en miocitos tratados con ouabaína sin afectar su respuesta inotrópica.

Para comprobar si la activación de CaMKII tiene importancia en el mecanismo arritmogénico activado por ouabaína, recurrimos en primera instancia a su inhibición farmacológica con KN-93. Luego de alcanzar un acortamiento estable las células fueron perfundidas con KN-93 2.5 μM durante 5 minutos, previo a comenzar el tratamiento con ouabaína 50 μM + KN-93 2.5 μM . En estos experimentos el tratamiento con KN-93 en la concentración mencionada, no afectó la amplitud de acortamiento celular en condiciones basales. Como puede observarse en el registro de acortamiento celular mostrado en la figura 13A, la célula tratada con KN-93 desarrolló un aumento en la amplitud de sus contracciones al ser perfundida con ouabaína, sin embargo al dejar de ser marcapaseada, exhibió un bajo número de CE. Adicionalmente, ante la posibilidad de obtener efectos inespecíficos con KN-93, utilizamos también un análogo estructural del mismo, incapaz de prevenir la activación de CaMKII (KN-92). En el panel B de la figura 13, se presenta un registro de acortamiento celular representativo, en el cual tras 5 minutos de pretratamiento con KN-92 la célula exhibe una respuesta inotrópica positiva al tratamiento con ouabaína, y desarrolla un elevado número de CE al retirar el marcapaseo eléctrico.

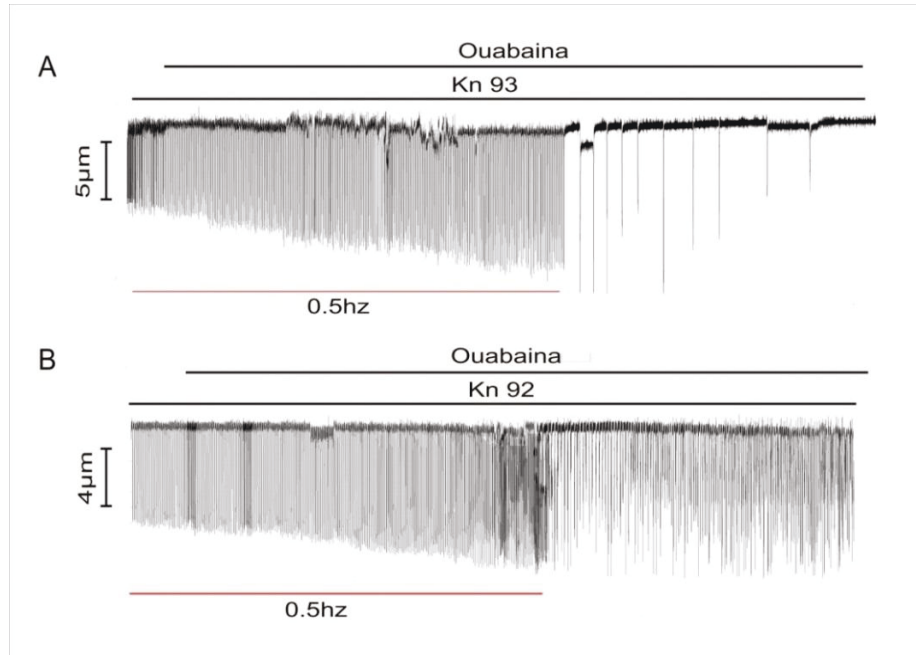


Figura 13: Trazos representativos del registro de acortamiento celular en cardiomiocitos tratados con ouabaína 50 μM , en presencia de KN-93 (a) y de su análogo estructural inactivo, KN-92 (B), que permiten observar la respuesta inotrópica alcanzada y la frecuencia de contracciones espontáneas luego de retirado el marcapaseo a 0.5 Hz.

En la figura 14 se presentan los resultados que indican el valor promedio de CE en los 10 minutos finales del protocolo experimental. Se puede observar que el valor promedio de CE registradas en 10 minutos en células tratadas con ouabaína, y con ouabaína+KN-92, es significativamente mayor al registrado en células control. En cambio, el promedio de CE registradas en las células tratadas con ouabaína + KN-93 fue similar al del grupo control. De la misma forma, el incremento en la frecuencia de CE promovido por el tratamiento con ouabaína fue prevenido en aquellas células tratadas con 1 μ M de AIP (Autocamtide-2 related inhibitor Peptide), un inhibidor de CaMKII estructuralmente diferente al KN-93. Finalmente, al comparar el número de CE registrado en células control con la frecuencia de CE registrada en los grupos tratados con ouabaína + KN-93 y ouabaína + AIP, podemos observar que si bien el número de CE mostró una tendencia a aumentar en estos dos últimos, no existe entre los tres grupos una diferencia estadísticamente significativa.

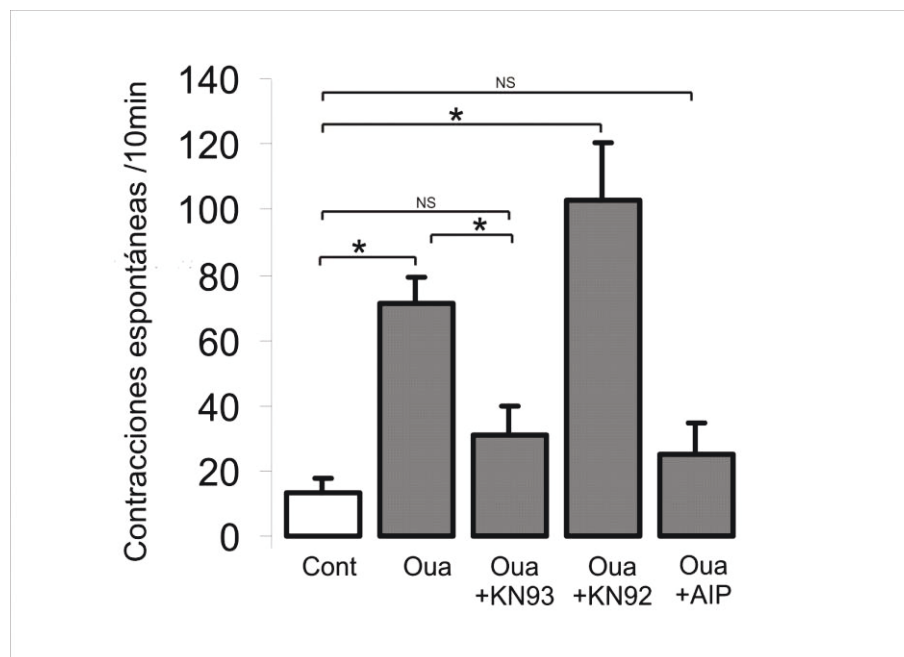


Figura 14: Resultados promedio que presentan el número de contracciones celulares espontáneas registradas en 10 minutos. * Indica $p < 0.05$. Cont (sin tratamiento farmacológico), Oua y Oua+KN-93: $n=16$ por grupo, Oua+KN-92: $n=10$, Oua+AIP: $n=5$.

Además, tal como muestra la figura 15, el aumento promedio en la fracción de acortamiento celular fue del $57.3 \pm 13\%$ ($n=13$) en el grupo tratado con ouabaína, y de $49.7 \pm 13.3\%$ ($n=14$) en el grupo tratado con ouabaína+KN-93. Este análisis se realizó comparando el aumento porcentual en la amplitud de acortamiento celular, medido tras 15 minutos de tratamiento con ouabaína, ya que a los 15 minutos todas las células se encontraban en la fase de “meseta” de la respuesta inotrópica.

En base a estos resultados, consideramos que el co-tratamiento con KN-93 no afectó la respuesta inotrópica al tratamiento con ouabaína, ya que a pesar de observarse una tendencia a ser menor en el grupo tratado con KN-93, esta no resulta estadísticamente significativa.

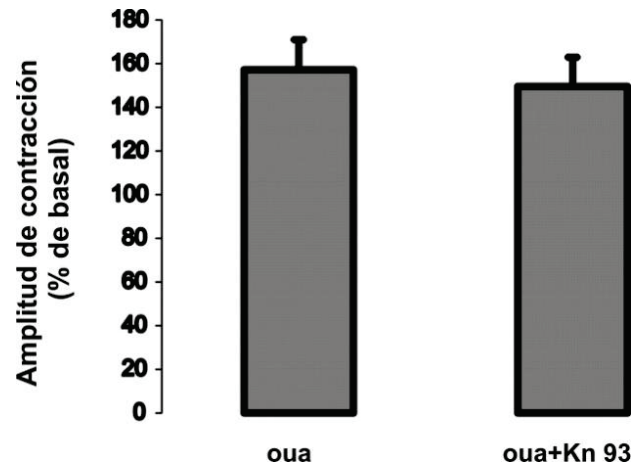


Figura 15: Resultados promedio que muestran el porcentaje de aumento en el acortamiento celular luego de 15 minutos de tratamiento con ouabaína 50 μM , en ausencia y presencia de KN-93 2.5 μM . Test de T: $P > 0.5$ considerado no significativo.

IV. Efecto inotrópico y arritmogénico del tratamiento con ouabaína en ratones que expresan un inhibidor endógeno de CaMKII.

Con el objetivo de confirmar por un método no farmacológico la importancia de la activación de CaMKII y su efecto sobre blancos proteicos ubicados a nivel del RS, realizamos experimentos en cardiomiocitos aislados de ratón, utilizando tanto ratones BALB-C (grupo control) como ratones de la cepa SR-AIP.

Como se describió previamente, la cepa SR-AIP expresa el péptido inhibidor específico de CaMKII denominado AIP (Autocamtide-2-related Inhibitory Peptide), el cual permanece localizado a nivel de la membrana del RS, inhibiendo la fosforilación de blancos moleculares de CaMKII allí ubicados (Ji Y. *J Biol Chem* 2003).

Mediante el registro continuo de la longitud celular evaluamos la amplitud de acortamiento durante 25 minutos de marcapaseo eléctrico a 0.5 Hz, lo que permitió calcular la respuesta inotrópica al tratamiento con ouabaína 50 μM .

Luego de 5 minutos de estabilizar la función contráctil marcapaseando a 0.5 Hz con perfusión continua de solución HEPES, las células fueron tratadas con ouabaína, que se añadió a dicha perfusión continuando con el marcapaseo a 0.5 Hz durante 20 minutos.

Tal como se observa en la figura 16, este tratamiento condujo a un aumento porcentual en la amplitud de acortamiento de 66 ± 5 % en los cardiomiocitos BALB-C (n=8) y de 73 ± 3 % en cardiomiocitos SR-AIP (n=8).

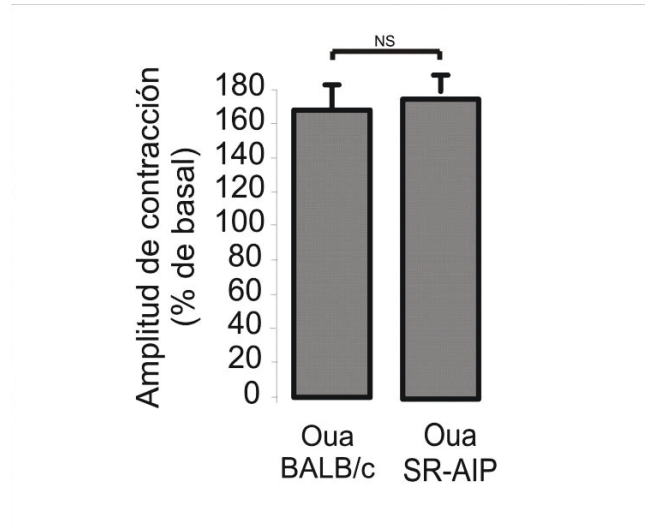


Figura 16: Resultados promedio que muestran la respuesta inotrópica porcentual, alcanzada en cardiomiocitos ventriculares de ratones BALB-C y SR-AIP, luego de 15 minutos de tratamiento con ouabaína 50 μ M.

A continuación, se discontinuó el marcapaseo eléctrico y se contabilizó el número de CE durante un período de 10 minutos manteniendo la perfusión con Hepes + ouabaína 50 μ M. Observando los registros continuos de longitud celular presentados en la figura 17A se puede comprobar que, en cardiomiocitos de ratones BALB-C, el tratamiento con ouabaína reprodujo el efecto arritmogénico observado en cardiomiocitos de rata.

El panel B de la figura 17 muestra un promedio de 23 ± 7 CE en 10 minutos en miocitos BALB-C perfundidos con buffer Hepes (n=8) y 78 ± 18 CE en aquellos tratados con ouabaína (n=8). En el mismo panel se puede observar que el tratamiento con ouabaína no provocó un efecto arritmogénico al ser aplicado en cardiomiocitos SR-AIP, ya que registramos un promedio de 27 ± 9 en 10 minutos (n=6) en cardiomiocitos SR-AIP perfundidos con solución Hepes y un promedio de 25 ± 10 CE en 10 minutos en cardiomiocitos SR-AIP tratados con ouabaína (n=6).

Los resultados obtenidos nos permiten resaltar que en las células SR-AIP ocurre una disociación entre la respuesta inotrópica y el efecto arritmogénico, ya que en ellas el tratamiento con ouabaína promueve un aumento en el acortamiento celular sin incrementar la frecuencia de contracciones espontáneas.

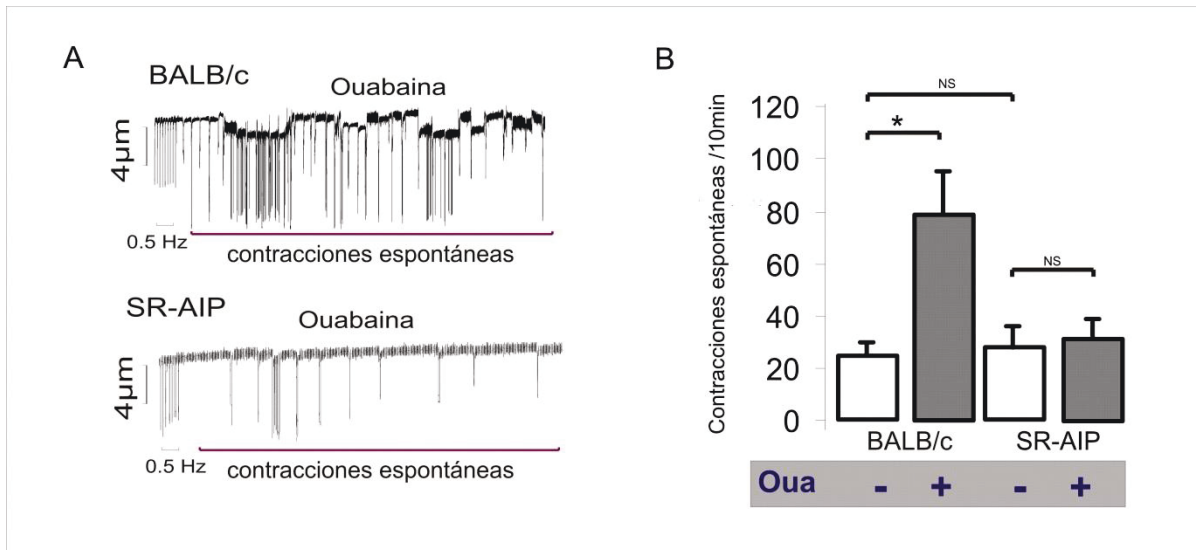


Figura 17: Frecuencia de CE registrada en cardiomiocitos de ratones BALB-C y SR-AIP. **A:** trazos representativos del registro de acortamiento celular que permite observar la frecuencia de CE luego de interrumpir la estimulación eléctrica. **B:** Gráficos promedio que comparan el número de contracciones espontáneas ocurridas en 10 minutos.

V. La sobreexpresión de CaMKII exacerbaba el efecto arritmogénico del tratamiento con ouabaína en cardiomiocitos de rata.

Considerando valiosa la posibilidad de evaluar el papel que cumple la actividad de CaMKII en las arritmias inducidas por digitálicos por un método diferente a su inhibición, nos propusimos obtener un modelo celular de sobreexpresión de la isoforma δ c de CaMKII en cardiomiocitos de ratas adultas (ver detalles en la sección métodos), teniendo también en cuenta que los niveles de expresión de esta proteína se encuentran aumentados en distintos estados patológicos (Sosalla. Basic res card 2011).

La sobreexpresión se logró mediante transducción viral, realizada sobre cardiomiocitos ventriculares mantenidos en cultivo primario durante 24 horas. Para sobreexpresar CaMKII se utilizó un vector viral adeno-asociado que contiene el gen codificante para CaMKII δ c (**Ad. CaMKII**), como grupo control se emplearon cardiomiocitos transducidos con un vector adeno-asociado que porta el gen codificante de β -galactosidasa (**Ad. β gal**).

La figura 18 muestra que los cardiomiocitos conservan su estructura sarcomérica y morfología luego de 24 horas en cultivo, pudiéndose observar una robusta expresión de la proteína fluorescente verde (GFP), cuyo gen fue utilizado como reportero de transducción, para confirmar la sobreexpresión de la proteína de interés en cada grupo.

Paralelamente, la capacidad de inducir la sobreexpresión de CaMKII mediante esta técnica, fue confirmada mediante inmunodetección por western blot (fig 18b).

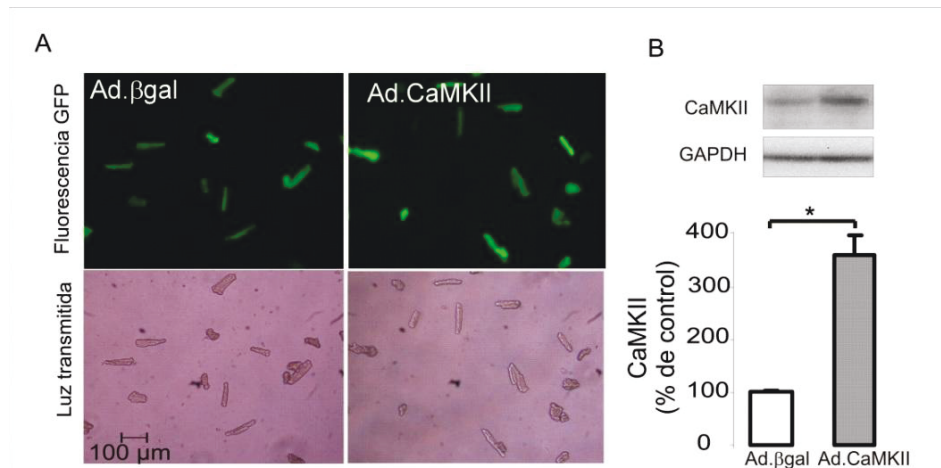


Figura 18: Controles de expresión adenoviral. **A:** Imágenes representativas de la fluorescencia emitida por la Proteína Fluorescente Verde (GFP) y de estructura celular por luz transmitida. **B:** Blots representativos y barras promedio que demuestran que la expresión de CaMKII en las células Ad.CaMKII es significativamente mayor que en las células Ad.β-galactosidasa (normalizado por la expresión de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Con estas células (Ad. βgal y Ad. CaMKII), una vez determinada la expresión de los genes contenidos en el vector viral mediante la visualización de GFP, se realizaron experimentos funcionales de medición de acortamiento celular y contabilización de CE, similares a los descritos previamente.

Interesantemente, cuando se compara el acortamiento basal y la frecuencia de CE en cardiomiocitos que no son tratados con ouabaína; tanto los que sobreexpresan βgal como aquellos que sobreexpresan CaMKII muestran un acortamiento porcentual similar, y no presentan diferencia significativa en el número de CE registradas luego de 20 minutos de marcapaseo a 0.5 Hz. En ambos grupos, la frecuencia de CE es menor a la registrada en células de rata evaluadas en fresco, lo que resulta esperable ya que responde a un fenómeno de adaptación descrito en cardiomiocitos cultivados (Louch WE. *J Mol Cell Cardiol* 2011). Por otra parte, como muestra la figura 19, la sobreexpresión de CaMKIIδc no resultó en una modificación significativa de la respuesta inotrópica al tratamiento con ouabaína.

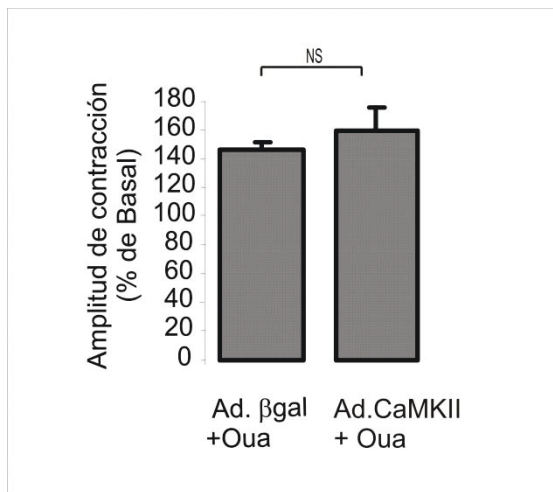


Figura 19: Resultados promedio de la respuesta inotrópica porcentual obtenida en células Ad. βgal y Ad. CaMKII luego de 15 minutos de tratamiento con 50 μM de ouabaína. NS: $p > 0.05$ considerado no significativo.

La figura 20 muestra trazos representativos y resultados promedio del número de CE registrado en cardiomiocitos de rata, que fueron cultivados durante 24 horas para inducir la sobreexpresión de CaMKIIδc

mediante la transducción con un vector viral. Tras 20 minutos de perfusión con Oua 50 μM, estas células desarrollaron un promedio de 39 ± 12 CE en 10 minutos ($n=6$); en cambio al aplicar el mismo tratamiento sobre células control que sobreexpresaron β-galactosidasa, registramos un promedio de 9 ± 3 CE en 10 minutos ($n=6$).

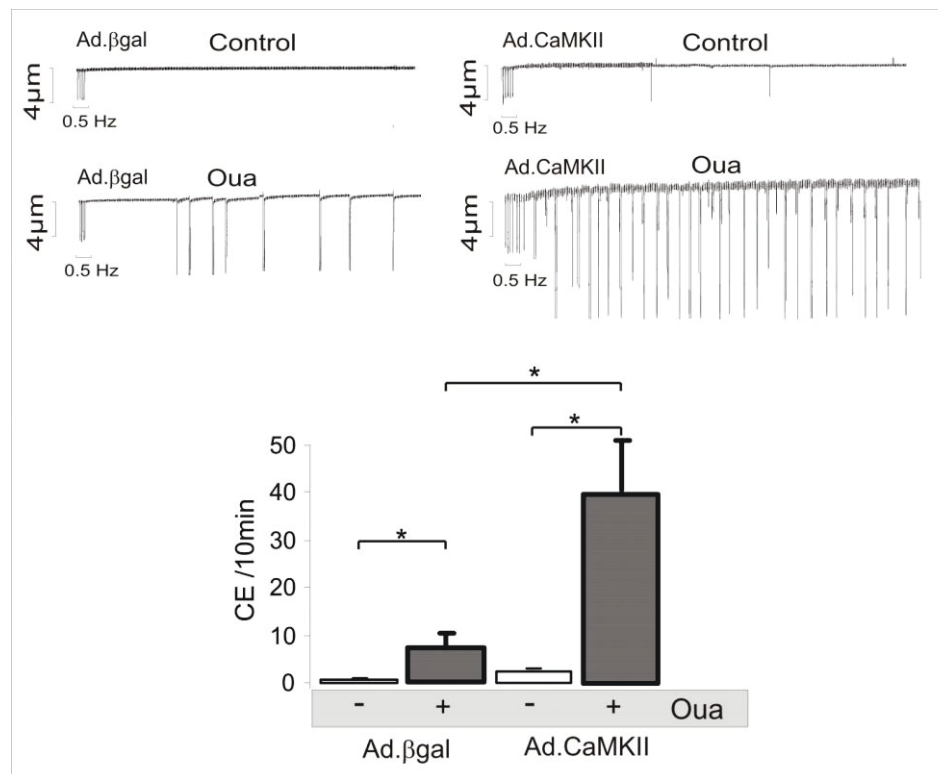


Figura 20: La sobreexpresión de la isoforma δc de CaMKII exacerba el efecto arritmogénico promovido por el tratamiento con ouabaína. Registros representativos de largo celular y datos promedio que muestran el número de CE registradas en 10 minutos, luego del tratamiento con Oua 50 μM en células Ad.βgal y Ad.CaMKII.

En conjunto, estos datos constituyen otra evidencia experimental que sugiere que la actividad de CaMKII durante la administración de ouabaína esta fisiopatológicamente ligada al efecto proarritmogénico observado, sin tener impacto en la respuesta inotrópica obtenida con dosis altas de dicho glucósido cardiotónico. Sugieren además, que distintas situaciones patológicas que cursan con sobreexpresión de CaMKII (Sosalla. Basic res card 2011), podrían aumentar la susceptibilidad para padecer arritmias inducidas por digitálicos.

VI. Mecanismo por el cual CaMKII promueve liberaciones proarritmogénicas de Ca^{++} .

Las liberaciones espontáneas de Ca^{++} desde el RS hacia el citosol, cuando se producen en forma de ondas de Ca^{++} promueven las contracciones espontáneas que utilizamos hasta el momento como índice de actividad arritmogénica a nivel celular; pero su consecuencia más importante es la inducción de una corriente despolarizante capaz de alterar el potencial de membrana, produciendo las DADs descritas previamente.

Como se describió anteriormente, al menos 2 factores pueden incrementar la probabilidad de aparición de ondas de Ca^{++} : 1- Un aumento en la carga de Ca^{++} dentro del RS y 2- Un aumento en la probabilidad de apertura de los RyR₂. Se conoce que la actividad de CaMKII puede influir sobre ambos factores, dado que es capaz de fosforilar tanto a PLB como a los RyR₂.

Su posible efecto sobre la carga luminal de Ca^{++} en el RS se debe a que mediante la fosforilación del residuo treonina 17 (Thr-17) de Fosfolamban (PLB) libera la inhibición que esta proteína ejerce sobre la actividad de SERCA, promoviendo una mayor tasa de secuestro de Ca^{++} hacia el RS durante el período diastólico (haciendo que la retoma mediada por SERCA predomine con respecto a la extrusión mediada por el NCX) (Frank KF. Cardiovasc Res 2003).

Por otro lado la fosforilación del RyR₂ ha sido descrita como promotora de la apertura del mismo (Currie S. Biochem J 2004; van Oort. Circulation 2010), lo que aumentaría la probabilidad de desarrollo de ondas de Ca^{++} para una determinado contenido de Ca^{++} en el RS.

Teniendo en cuenta estas posibilidades nos propusimos evaluar si CaMKII incrementa la probabilidad de liberación espontánea de Ca^{++} desde el RS por aumentar la carga de Ca^{++} mediante la fosforilación de PLB, por afectar la función de los RyR₂ mediante la fosforilación del residuo Ser-2814, o por una combinación de ambos mecanismos.

VI.a. Contenido de calcio dentro del retículo sarcoplasmático durante el tratamiento con altas concentraciones de ouabaína.

Para evaluar el efecto que los distintos tratamientos producen sobre el contenido de Ca^{++} dentro del RS de los cardiomiocitos, evaluamos por epifluorescencia la amplitud del transitorio de Ca^{++} producido tras la aplicación de un pulso de cafeína, técnica clásicamente utilizada para estimar el contenido o carga luminal de Ca^{++} en el RS (detallado en sección métodos).

Conjuntamente, evaluamos el efecto que el tratamiento con ouabaína provoca sobre el estado de fosforilación en Thr-17 de PLB. La figura 21A muestra experimentos representativos y datos promedio de la inmunodetección, realizada mediante la técnica de western blot. Estos experimentos demuestran un aumento en la fosforilación del residuo Thr-17 de PLB en respuesta al tratamiento con ouabaína, siendo este efecto prevenido al inhibir la actividad de CaMKII con KN-93.

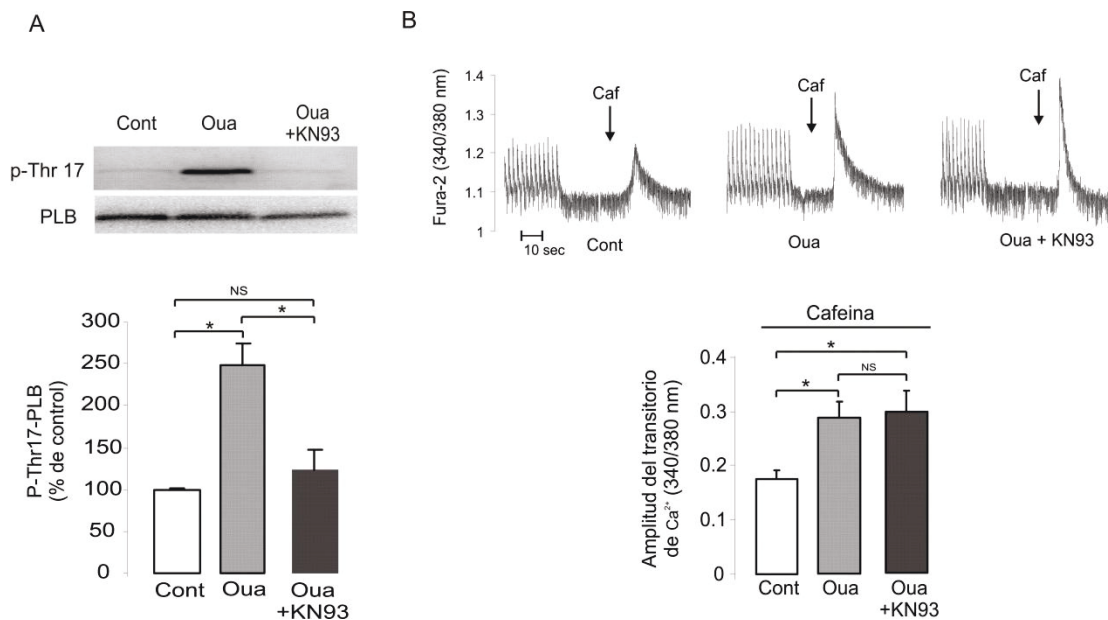


Figura 21: Efecto del tratamiento con ouabaína sobre la fosforilación de Fosfolamban y el contenido de Ca^{++} en el RS. **A:** Experimento representativo y resultados promedio de la inmunodetección de fosforilación en Thr-17 de PLB en corazones de rata perfundidos durante 20 minutos con solución HEPES: sin tratamientos farmacológicos (Cont), con ouabaína 50 μM , o con Oua + KN-93 (n=5 por grupo). **B:** Trazos representativos y resultados promedio de la amplitud de los transitorios de Ca^{++} inducidos por aplicación de pulsos de cafeína 15 mM. Experimentos realizados en cardiomiocitos perfundidos durante 20 minutos con solución HEPES: sin tratamientos farmacológicos (Cont), con ouabaína 50 μM , o con ouabaína + KN-93 (n= 8 por grupo).

En 21B se observan trazos representativos y resultados promedio de la amplitud de la liberación de Ca^{++} del RS hacia el citosol, producida en respuesta al pulso de cafeína. Se observa un aumento significativo en la carga de Ca^{++} del RS luego de 20 minutos de tratamiento con Ouá 50 μM , que se repite en las células tratadas con Ouá en presencia de KN-93.

Estos resultados indican que el tratamiento con ouabaína incrementa la fosforilación en Thr-17 de PLB y cursa con un aumento en el contenido de Ca^{++} dentro del RS. Sin embargo a pesar de que la fosforilación de PLB podría favorecer la retoma de Ca^{++} hacia el RS, no resulta imprescindible para que aumente la carga del RS durante el tratamiento digitálico, dado que la inhibición de CaMKII no tuvo impacto en el contenido de Ca^{++} registrado en cardiomiocitos tratados con ouabaína.

Para comprobar la importancia que la fosforilación de PLB tiene en la generación de EE mediante otra estrategia experimental, realizamos experimentos en ratones que expresan una variedad doble-mutante de PLB, la cual no es susceptible de ser fosforilada debido al reemplazo de sus residuos fosforilables (PLB-DM, detallado en sección métodos) (Brittsan AG. J Biol Chem 2000; Brittsan AG. Circ Res 2003).

La figura 22 muestra que tanto en condiciones basales como en respuesta al tratamiento con ouabaína, las células PLB-DM exhiben un promedio de 20 ± 8 y 87 ± 11 CE en 10 minutos respectivamente, valores que no difieren significativamente de los valores promedio contabilizados en células de ratones silvestres (WT) (n=6 por grupo).

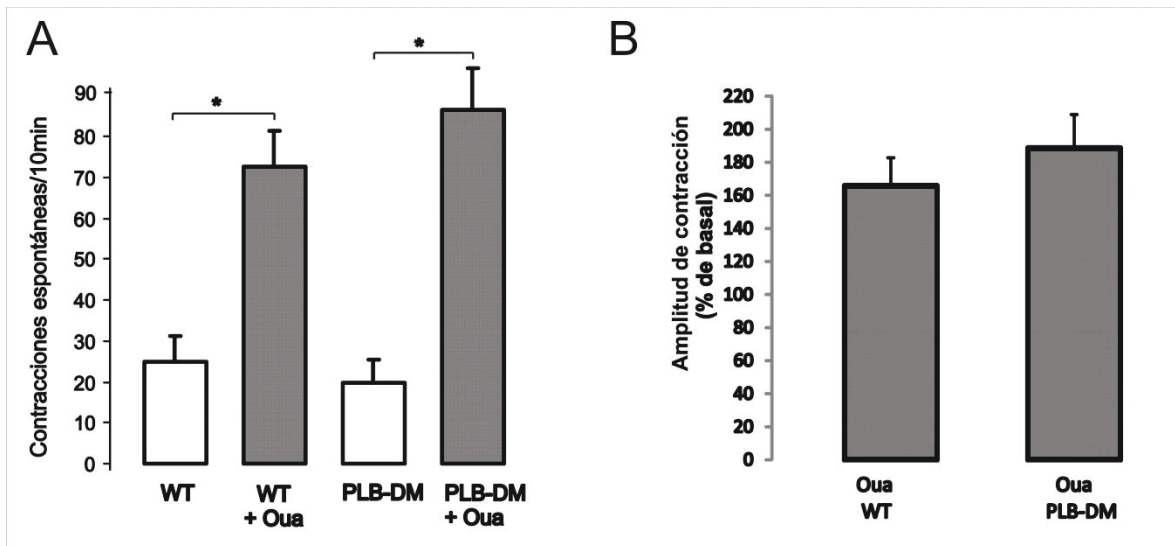


Figura 22: Resultados promedio que muestran: **A.** Número de contracciones espontáneas que presentan los cardiomiocitos provenientes de ratones WT y PLB-DM en ausencia y en presencia de ouabaína. **B.** Aumento porcentual en la amplitud de acortamiento celular registrado luego de 15 minutos de tratamiento con ouabaína 50 μ M en cardiomiocitos WT y PLB-DM

El hecho de que los cardiomiocitos PLB-DM respondan al tratamiento con ouabaína aumentando su frecuencia de contracciones espontáneas sugiere que la fosforilación de PLB no es un suceso relevante en el mecanismo arritmogénico promovido por Digitálicos.

Adicionalmente, evaluamos el impacto que la inhibición de CaMKII tiene en esta cepa, realizando el tratamiento con ouabaína 50 μ M en presencia de KN-93 2,5 μ M. En estas células, tal como puede observarse en el panel B de la figura 23, la inhibición de CaMKII no afectó la respuesta inotrópica al tratamiento con ouabaína, pero fue capaz de prevenir el aumento en el número de CE asociado a dicho tratamiento (n=6).

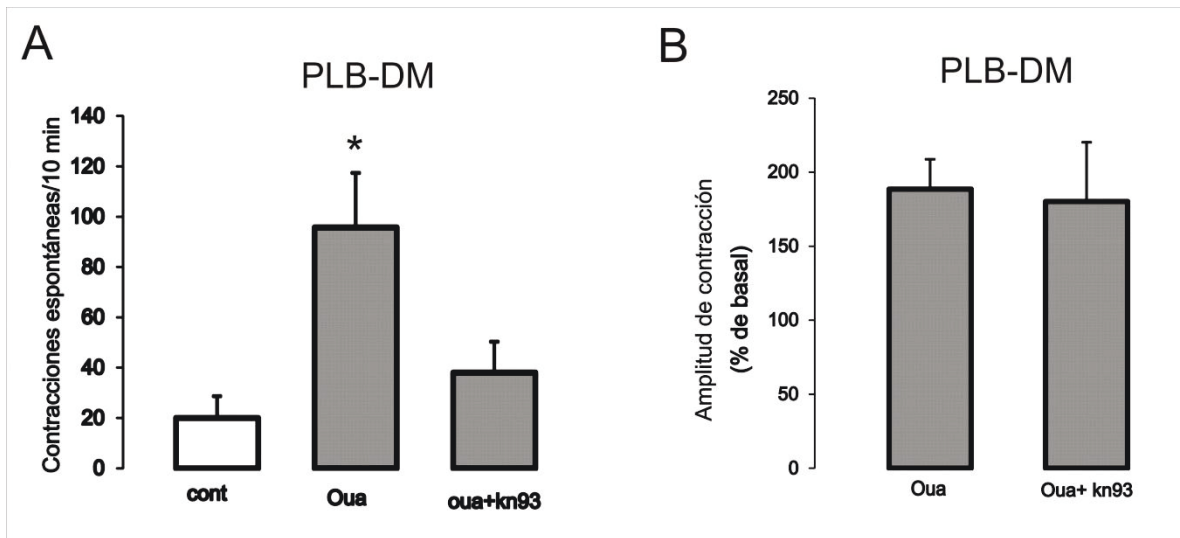


Figura 23: Resultados promedio que muestran el efecto del tratamiento con ouabaína 50 μM en presencia o ausencia del inhibidor de CaMKII en cardiomiocitos PLB-DM.

VI.b. CaMKII fosforila a los RyR₂ aumentando la liberación espontánea de Ca⁺⁺ del RS durante el tratamiento con concentraciones arritmogénicas de ouabaína.

Como se describió previamente, CaMKII fosforila a un residuo Serina específico en los RyR₂ (Ser-2814), cuya fosforilación ha sido relacionada con la pérdida espontánea de Ca⁺⁺ hacia el citosol en diferentes modelos arritmogénicos (Curran J. J Mol Cel Cardiol 2011; Liu N. J Mol Cel Cardiol 2011; Sag CM. Circ Heart Fail 2009). Para comprobar si el tratamiento agudo con 50 μM de ouabaína es capaz de promover la fosforilación de los RyR₂ en Ser-2814, perfundimos corazones de rata durante 20 minutos en un sistema de perfusión tipo Langendorff y las muestras obtenidas fueron procesadas para la inmunodetección de Ser-2814 fosforilado (p-Ser-2814).

Tal como lo indica el experimento representativo y los resultados promedio presentados en la figura 24, el tratamiento con ouabaína 50 μM condujo a un incremento significativo en la detección de RyR₂ Ser-2814 fosforilado. Adicionalmente puede observarse que la inhibición farmacológica de CaMKII con KN-93 2,5 μM impidió dicho aumento, lo que indica que dicha fosforilación depende de esta quinasa.

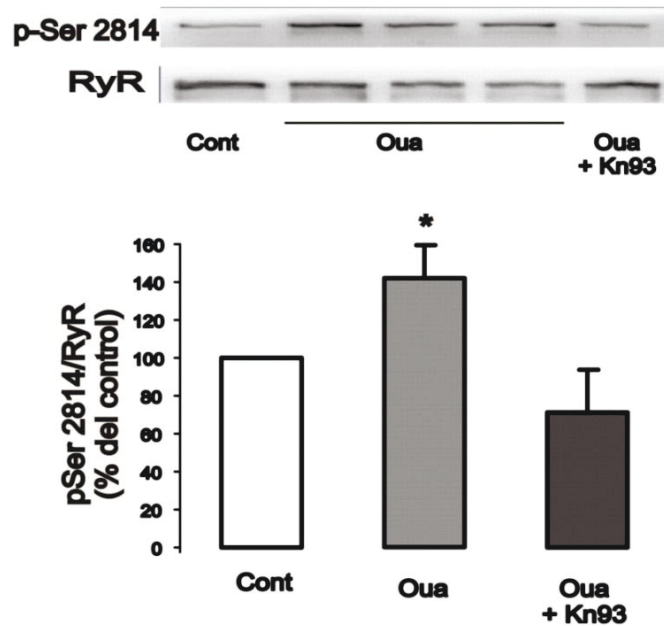


Figura 24: Experimentos representativos de la inmunodetección de p-Ser-2814 y RyR₂ total por western blot, y resultados promedio del cociente pSer-2814/RyR₂ total. **Cont:** corazones perfundidos con solución Hepes durante 20 minutos (n=5). **Oua:** corazones perfundidos con solución hepes + ouabaína 50 μ M durante 20 minutos (n=5). **Oua+KN-93:** corazones perfundidos con solución hepes + ouabaína+ KN-93 2,5 μ M durante 20 minutos (n=5).

Teniendo en cuenta que la actividad de CaMKII se asocia a la fosforilación de los RyR₂ durante el tratamiento con ouabaína, nos propusimos determinar la importancia funcional de esta fosforilación, evaluando la frecuencia con la que estos canales se abren en forma espontánea y transitoria permitiendo registrar la aparición de chispas de Ca⁺⁺. La dinámica de liberación espontánea de Ca⁺⁺ desde el RS hacia el citosol fue estudiada en cardiomiocitos de rata cargados con el fluoróforo Fluo-3, cuya emisión sensible a Ca⁺⁺ citosólico fue registrada por microscopía confocal (ver métodos). En estos experimentos la señal fluorescente emitida por el indicador permite discriminar eventos locales y transitorios (chispas de Ca⁺⁺), dado que proviene de un plano focal ubicado dentro de una región específica de la célula. La célula, en la profundidad enfocada, es incidida por un barrido longitudinal del láser tal como lo señala la línea cortada en la imagen superior derecha de la figura 25.

En estas condiciones experimentales es registrado el aumento en la señal fluorescente generado por la liberación de Ca⁺⁺ desde el RS hacia el citosol, que se propaga a lo largo de la célula. Este tipo de registro obtenido por microscopía confocal se denomina "Onda de Ca⁺⁺", aunque responden al mismo evento celular que previamente denominamos EE en registros de acortamiento y epifluorescencia.

La frecuencia de aparición de chispas y ondas de Ca^{++} fue monitoreada durante 30 segundos (10 barridos de 3 segundos cada uno), luego de transcurrido un minuto sin marcapaseo eléctrico. En la figura 25 se pueden observar imágenes representativas y resultados promedio que evalúan la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{++} registrada luego de 20 minutos de marcapaseo a 0.5 Hz.

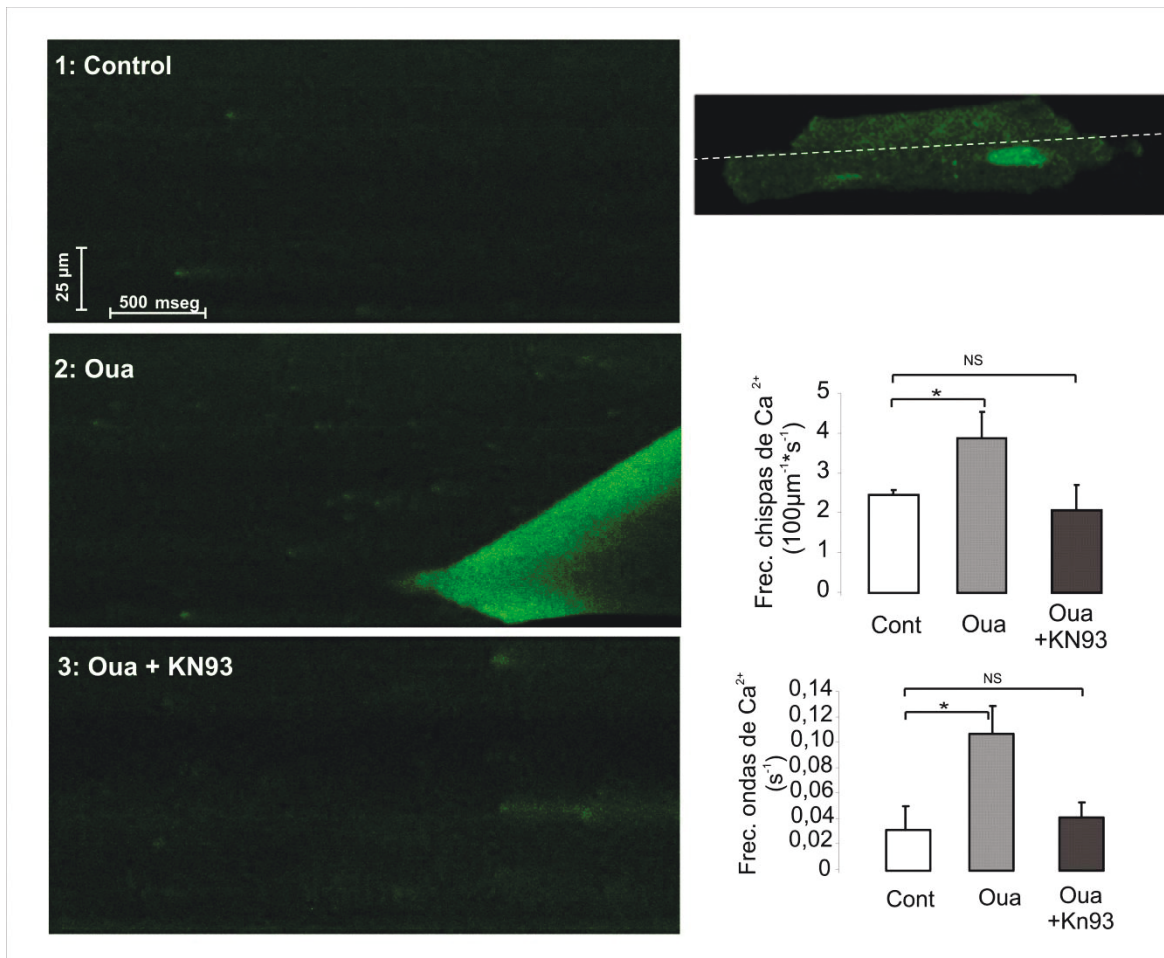


Figura 25: Imágenes representativas y resultados promedio obtenidos en cardiomiocitos de rata estudiados por microscopía confocal. La señal fluorescente emitida por Fluo-3 fue adquirida mediante barridos de 3 segundos de duración, que recorren la célula en sentido longitudinal, tal como lo indica la línea cortada en el panel superior derecho.

La imagen representativa 1 permite observar la baja frecuencia de chispas de Ca^{++} que presenta una célula control sin marcapaseo eléctrico (perfundida durante 20 minutos con solución Hepes). En contraste, la imagen 2 muestra la secuencia de chispas de Ca^{++} que se sucede en una célula tratada con ouabaína $50\mu\text{M}$. Esta imagen permite también observar

el desarrollo de una onda de Ca^{++} , que se origina a partir de una chispa de Ca^{++} y se propaga en ambas direcciones a lo largo de la región celular estudiada. La imagen 3 corresponde a la fluorescencia adquirida en un cardiomiocito que antes del tratamiento con ouabaína 50 μM (y durante los 20 minutos que duró el mismo) fue perfundido en presencia de 2.5 μM de KN-93. En esta célula, si bien se observan chispas de Ca^{++} , en ningún caso estas llegan a originar una onda de Ca^{++} .

Los resultados promedio permiten concluir que el tratamiento con ouabaína produce un aumento significativo en la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{++} , por un mecanismo que depende de la actividad de CaMKII, ya que no ocurre en aquellas células tratadas con oua + KN-93. Estos experimentos demuestran que el aumento en la frecuencia de CE registrado en cardiomiocitos tratados con ouabaína, encuentra su origen en la mayor tendencia de los RyR_2 a la apertura espontánea (no dependiente de la estimulación eléctrica). Estas aperturas permiten la salida de Ca^{++} hacia el citosol, como chispas de Ca^{++} capaces de promover la apertura de RyR_2 vecinos y propagar el proceso de liberación (onda de Ca^{++} /contracción espontánea).

VII. La inhibición de CaMKII es capaz de prevenir la aparición de arritmias ventriculares en un modelo *In Vivo* de intoxicación digitálica aguda.

Luego de haber obtenido evidencia experimental que sugiere que la activación de CaMKII cumple un papel importante en el desarrollo de un fenotipo arritmogénico en cardiomiocitos, nos propusimos evaluar el impacto que la actividad de esta quinasa tiene en la aparición de arritmias en un modelo de intoxicación digitálica *In Vivo*. Con este propósito realizamos el monitoreo electrocardiográfico en ratones BALB-C y SR-AIP tratados con una inyección intraperitoneal de 10 mg/Kg de ouabaína.

En ausencia de tratamientos, los ratones no exhibieron alteraciones electrocardiográficas, mientras que como lo muestran los registros representativos de la figura 26, el tratamiento con ouabaína fue seguido por la aparición de episodios de bradicardia y bloqueo A-V de primer y segundo grado, compatibles con un efecto parasimpático-mimético esperable durante el tratamiento con digitálicos. En este contexto, el tratamiento con ouabaína cursó con aparición de complejos QRS de origen ventricular y episodios de taquicardia ventricular, que derivaron en fibrilación ventricular y muerte (figura 261 b, c y d).

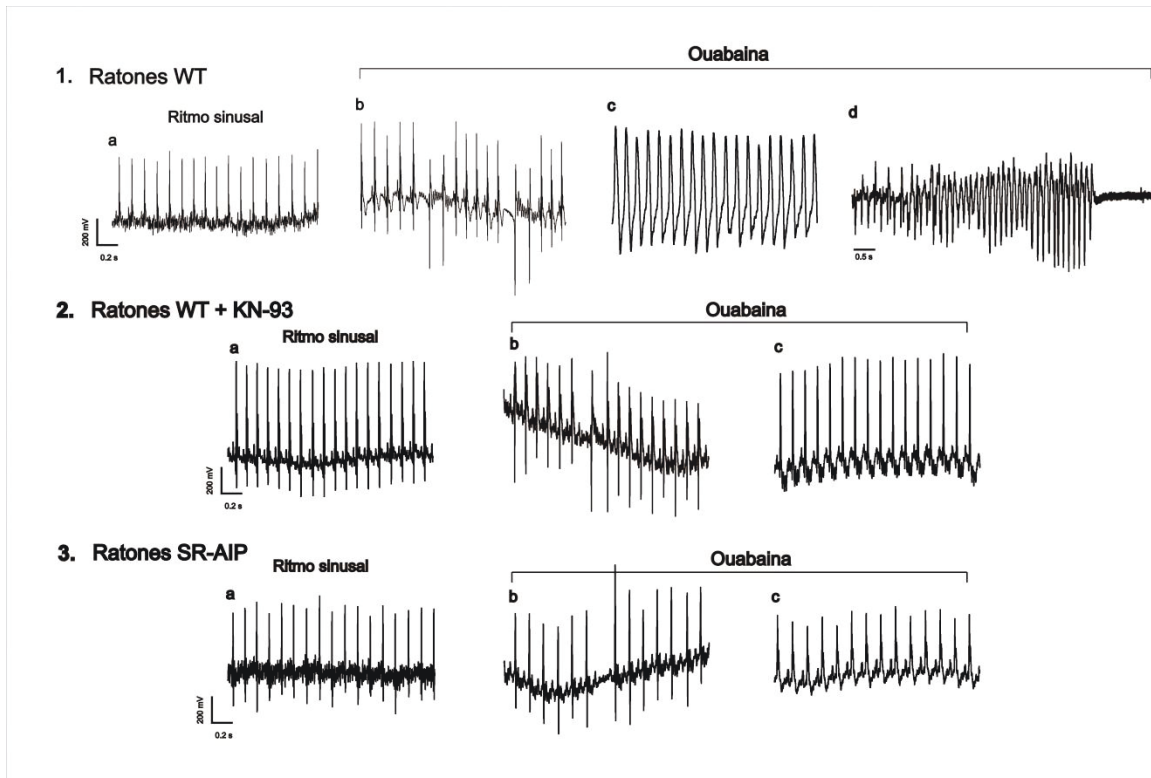


Figura 26: Secciones representativas del registro electrocardiográfico obtenido en ratones que fueron evaluados durante una hora, luego de la aplicación de 10mg/kg de ouabaína IP.

1: En **1a** se muestra un trazo representativo en ritmo sinusal, seguido de trazos que ejemplifican una secuencia de alteraciones electrocardiográficas acontecidas luego de la inyección intraperitoneal de ouabaína: efecto vagomimético del tratamiento en **1b**, taquicardia ventricular en **1c** y fibrilación ventricular en **1d**.

2: Trazos electrocardiográficos registrados en ratones BALB-C tratados con oua previo tratamiento con KN-93 30 $\mu\text{mol/Kg}$ IP (demostrando la aparición de complejos ventriculares ectópicos con posterior normalización de los registros).

3: Trazos electrocardiográficos registrados en ratones SR-AIP tratados con ouabaína (en los que se observa el efecto digitalico, sin manifestaciones de toxicidad)

En los paneles 2 y 3 de la figura 26 se observan secciones representativas del registro electrocardiográfico realizado en ratones BALB-C tratados con KN-93 y en ratones SR-AIP. En los mismos se puede observar la aparición de alteraciones compatibles con el efecto digitalico, entre ellas episodios de bradicardia o retraso en la conducción A-V.

En la tabla 2 se presenta la frecuencia de aparición de arritmias registradas en la hora posterior al tratamiento. En esta tabla se puede observar que todos los ratones tratados presentaron alteraciones electrocardiográficas compatibles con el efecto parasimpático-mimético de los digitalicos, y que 9 de 11 ratones BALB-C tratados con ouabaína desarrollaron episodios de taquicardia ventricular sostenida. En cambio, los dos grupos

restantes (Oua + KN-93 y SR-AIP + Oua) presentaron una menor incidencia de aparición de complejos ventriculares y taquicardia ventricular sostenida. La taquicardia ventricular sostenida fue definida como un episodio de al menos 10 complejos de origen ventricular sucesivos, según los criterios de Lambeth (Walker MJA. *Cardiovasc Res* 1988).

La menor incidencia de arritmias, registrada tanto en ratones BALB-C co-tratados con KN-93 como en ratones SR-AIP, se corelacionó con una menor mortalidad en estos ratones (murieron 3 de 9 BALB-C tratados con KN-93 y 1 de 5 SR-AIP, todos en las 2 horas posteriores al tratamiento) en comparación a la mortalidad post-tratamiento con ouabaína en ratones BALB-C (9 de 11, todos dentro de las 2 hs posteriores al tratamiento).

	BALB-C + Oua	BALB-C + Oua - KN93	SR- AIP + Oua
Ratones tratados	11	9	5
Bradycardia sinusal/bloqueo AV	11 (100%)	9 (100 %)	5 (100%)
Complejos ventriculares (>1/h)	9 (81.2 %)	3 (33.3%)	1 (20%)
Taquicardia ventricular sostenida	9 (81.2%)	2 (22.2%)	0 (0%)

Tabla 2: Incidencia de arritmias en ratones tratados con 10 mg/Kg IP de ouabaína.

VIII. El tratamiento agudo con altas concentraciones de digoxina reproduce el mecanismo fisiopatológico activado durante el tratamiento con ouabaína.

Considerando que el digitálico actualmente utilizado como herramienta terapéutica es la digoxina, realizamos experimentos en cardiomiocitos ventriculares de rata a fin de comprobar si los efectos celulares obtenidos al utilizar ouabaína son reproducidos mediante la utilización de una dosis equivalente de digoxina. En la figura 27A se presentan los resultados promedio del número de CE registrado durante 10 minutos luego de 20 minutos de tratamiento con 75 μ M de Digoxina. En estos experimentos el grupo control (perfundido con solución Hepes durante 20 minutos y marcapaseado a 0.5 Hz) exhibió 20 ± 4 CE en 10 minutos, pudiendo observarse un aumento significativo en el número de CE en aquellas células tratadas con digoxina, que no se observó en el grupo de células tratadas con digoxina + KN-93.

El panel B de la figura 27 permite apreciar los resultados promedio que muestran la amplitud de los transitorios de Ca^{++} inducidos por la aplicación de un pulso de cafeína 15 mM. Estos resultados indican que el tratamiento con digoxina 75 μ M produjo un incremento significativo en el contenido de Ca^{++} del RS, y que la magnitud de dicho aumento no fué alterada por la inhibición de CaMKII con KN-93 2.5 μ M.

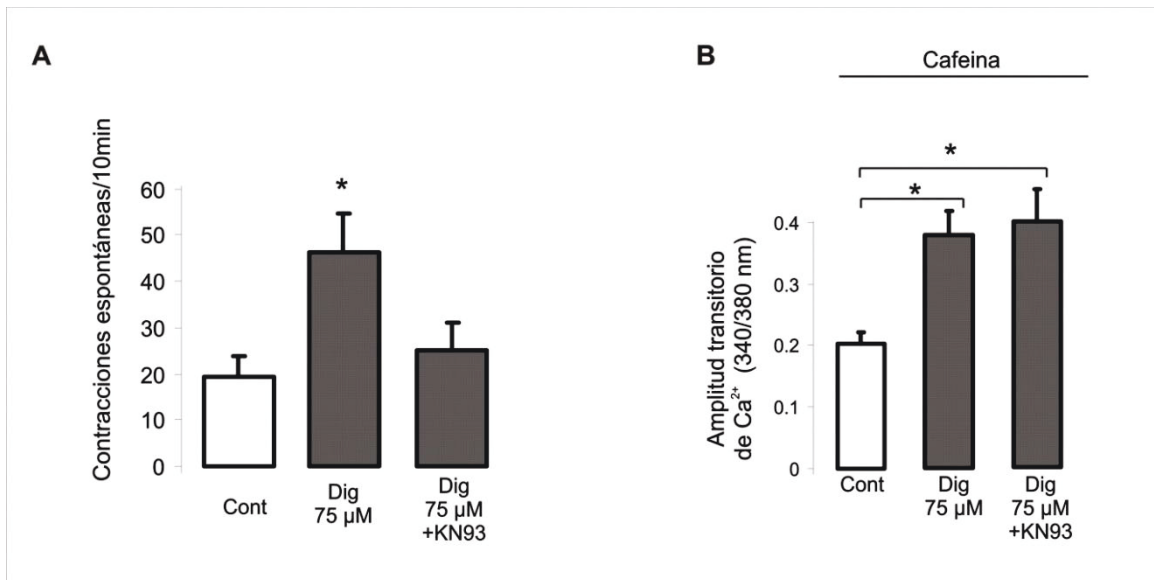


Figura 27. Resultados promedio obtenidos en cardiomiocitos tratados con Digoxina 75 µM. **A:** Número de CE registradas durante 10 minutos en cardiomiocitos ventriculares tratados con Digoxina en ausencia y en presencia de KN-93 (n=5 por grupo), **B:** Amplitud del transitorio de Ca²⁺ obtenido tras la aplicación de un pulso de Cafeína. * indica p< 0.05 respecto al control sin tratamientos.

Finalmente, al estudiar la frecuencia de chispas y ondas de Ca²⁺ en cardiomiocitos de rata tratados con Digoxina, encontramos un patrón similar al obtenido mediante la utilización de ouabaína. Esto puede comprobarse en los resultados promedio presentados en la figura 28, en donde se observa que el tratamiento con Digoxina 75 µM promueve un incremento significativo en la frecuencia de chispas y ondas de Ca²⁺, y que este aumento puede prevenirse mediante el co-tratamiento con KN-93 2,5 µM.

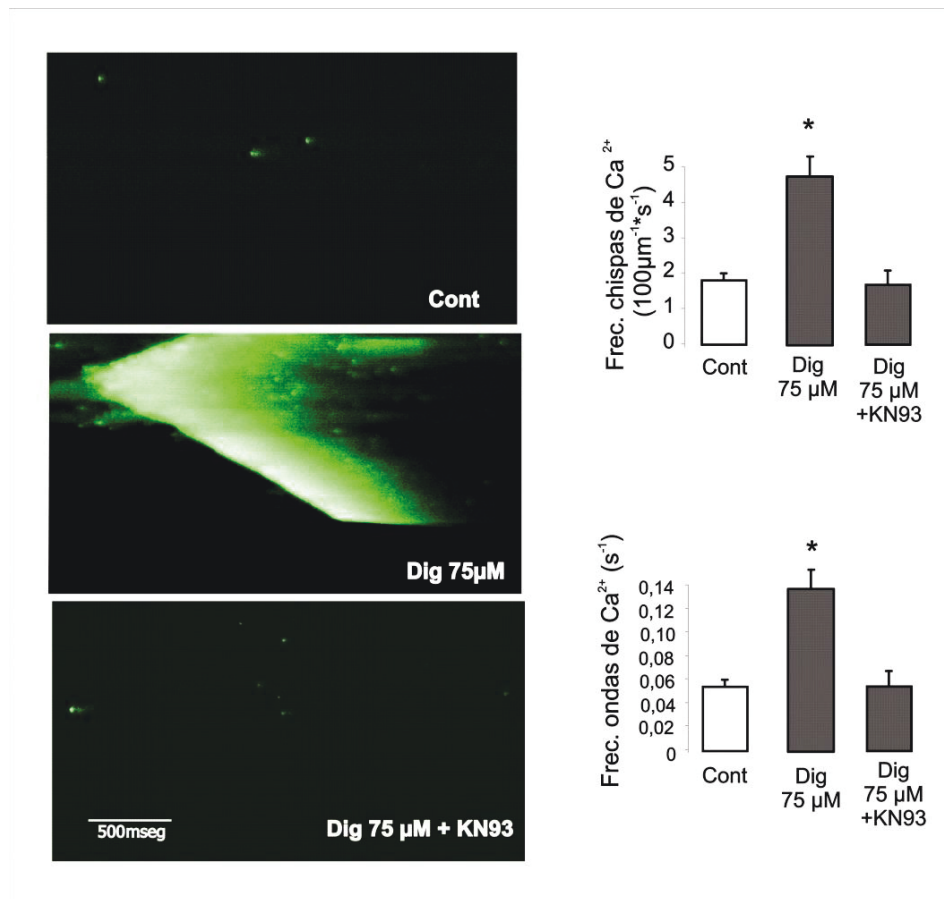


Figura 28: Imágenes representativas y resultados promedio obtenidos mediante el análisis de la señal fluorescente sensible a Ca⁺⁺ citosólico emitida por el indicador Fluo-3. Dig: Digoxina; cont: Control. * indica P < 0.05 respecto al control. (n=5 por grupo)

IX. Estabilización de los receptores de rianodina como alternativa en la prevención de arritmias inducidas por digitálicos.

Dado que la fosforilación de los RyR₂, parece ser un evento clave en el mecanismo arritmogénico promovido por la activación de CaMKII durante el tratamiento con digitálicos, nos propusimos investigar la eficacia que pudiera tener la “estabilización” farmacológica de los RyR₂ para prevenir las liberaciones espontáneas de Ca⁺⁺ durante la administración de digitálicos.

El concepto de estabilización es utilizado para referirse a la interacción molecular capaz de reducir la probabilidad de apertura de los RyR₂ durante el período diastólico (baja [Ca⁺⁺]_{citosólico}). En este sentido, tuvimos en cuenta las investigaciones llevadas adelante por diversos grupos que plantean la posibilidad de estabilizar a los RyR₂ como estrategia

terapéutica en diversos modelos que cursan con sobrecarga intracelular de Ca^{++} (Elliott EB. *Basic Res Cardiol* 2011; Kelly A. *Br J Pharmacol* 2012). Particularmente nuestro interés se centró en la evidencia aportada por el grupo del Dr. Wayne Chen (University of Calgary, Canada), que recientemente demostró la capacidad que posee el Carvedilol para estabilizar a los RyR_2 por un mecanismo independiente a su capacidad β -bloqueante (Zhou Q. *Nat Med* 2011).

Debido a que la concentración de Carvedilol necesaria para alcanzar la estabilización de los RyR_2 podría generar un efecto hipotensor en modelos *In Vivo* debido a su capacidad β -bloqueante, el grupo del Dr. Wayne Chen desarrolló un análogo estructural del carvedilol sin actividad β -bloqueante. El mismo, denominado VK-II-86, demostró ser efectivo en la reducción del tiempo de apertura de los RyR_2 y redujo la liberación espontánea de Ca^{++} en un modelo de ratones que poseen una mutación en estos canales (Zhou Q. *Nat Med* 2011). La estructura química de estos compuestos se presenta en la figura 29.

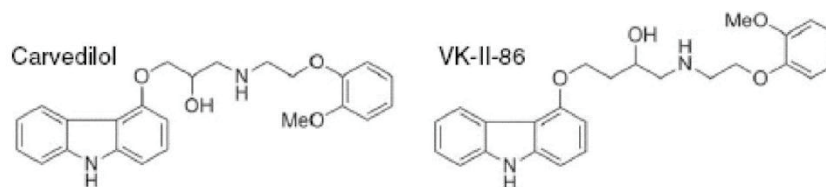


Figura 29: Estructura molecular del Carvedilol y su análogo VK-II-86.

IX.a. El Carvedilol es capaz de reducir el número de CE registrado en cardiomiocitos tratados con ouabaína.

Buscando comprobar si el carvedilol resulta efectivo como estabilizador de los RyR_2 durante la administración de digitálicos, realizamos experimentos registrando acortamiento celular en las condiciones descritas en secciones anteriores. Para poder descartar efectos derivados de la capacidad β -bloqueante del Carvedilol, recurrimos al tratamiento con ouabaína en presencia de 1 μM de Atenolol, otro β -bloqueante que no posee efecto estabilizador de los RyR_2 (Zhou Q. *Nat Med* 2011).

La figura 30 muestra los resultados promedio obtenidos al contabilizar el número de CE registrado en 10 minutos sin marcapaseo eléctrico, luego de haber tratado a cada célula con las drogas indicadas durante 20 minutos a 0,5 Hz. En la misma se puede comprobar que el tratamiento con Carvedilol 1 μM resultó efectivo para prevenir el aumento en el

número de CE que se produce como consecuencia del tratamiento con ouabaína, hecho que no ocurre utilizando Atenolol 1 μ M.

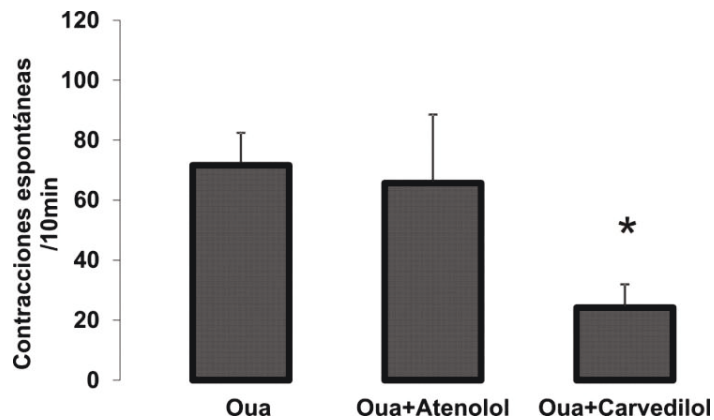


Figura 30: Datos promedio que muestran el efecto de 20 minutos de tratamiento con 50 μ M de ouabaína (n= 8), ouabaína + 1 μ M de Atenolol (n= 7) u ouabaína + 1 μ M de Carvedilol (n= 13) sobre el total de CE que desarrollan los miocitos ventriculares de rata durante 10 minutos sin marcapaseo eléctrico. *= p < 0.05.

La figura 31 presenta los resultados promedio que muestran la respuesta inotrópica obtenida a los 15 minutos de tratamiento con ouabaína 50 μ M, ouabaína + atenolol y ouabaína + carvedilol. La respuesta inotrópica tiende a ser menor en el grupo de células tratadas con ouabaína + atenolol, y esta reducción resulta significativa en aquellas tratadas con ouabaína + carvedilol.

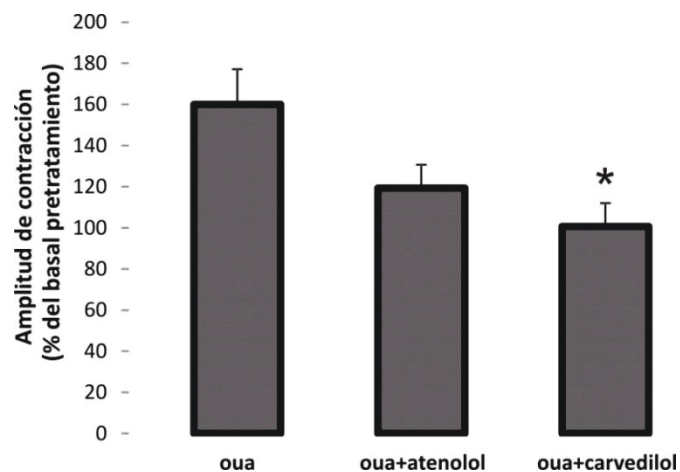


Figura 31: Datos promedio que muestran la respuesta inotrópica porcentual registrada en cardiomiocitos estimulados a 0.5 hz, luego de 15 minutos de tratamiento con: 50 μ M de ouabaína (n=8), ouabaína + 1 μ M de atenolol (n= 7) u ouabaína + 1 μ M de carvedilol (n= 13). *= p < 0.05.

Estos datos indican que el carvedilol es capaz de reducir la liberación espontánea de Ca^{++} en cardiomiocitos tratados con dosis arritmogénicas de ouabaína, y que esta propiedad es independiente de sus efectos β -bloqueantes ya que, como fue demostrado en otros modelos, no es compartida por el atenolol. Sin embargo, estas drogas interfirieron con el desarrollo de un efecto inotrópico positivo al ser utilizados en conjunto con ouabaína, por un mecanismo que aún no ha sido evaluado.

IX.b. VK-II-86 es capaz de prevenir el aumento en la frecuencia de CE, sin afectar la respuesta inotrópica al tratamiento con ouabaína en cardiomiocitos de rata.

Dado el impacto negativo que la utilización de carvedilol tuvo en la respuesta inotrópica desarrollada en nuestros experimentos, y a las dificultades que podría plantear su uso en modelos *In Vivo* debido a su efecto β -bloqueante, decidimos realizar experimentos utilizando VK-II-86 como estabilizador de los RyR_2 en el modelo de tratamiento agudo de cardiomiocitos de rata con una dosis arritmogénica de ouabaína. Para poder realizar estos experimentos contamos con el apoyo del Dr. Wayne Chen quién nos suministró VK-II-86, ya que en la actualidad no se encuentra disponible comercialmente.

La figura 32 presenta los resultados promedio que indican el aumento porcentual en la amplitud de acortamiento en respuesta al tratamiento con ouabaína 50 μM en ausencia y en presencia de VK-II-86 1 μM . En la misma comprobamos que el tratamiento con VK-II-86 no alteró significativamente la respuesta inotrópica de los cardiomiocitos a la ouabaína.

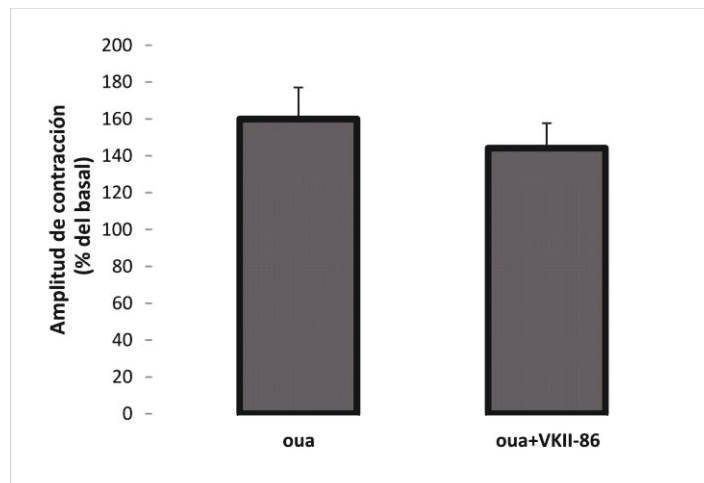


Figura 32: Datos promedio que muestran la respuesta inotrópica porcentual registrada en miocitos cardíacos marcapaseados a 0.5 hz, evaluada a los 15 minutos de tratamiento con ouabaína 50 μM (n=16) u ouabaína + VKII-86 1 μM (n=16).

Finalmente, como puede observarse en la figura 33, las células tratadas con ouabaína + VK-II-86 presentaron un número de CE en 10 minutos significativamente menor al registrado en cardiomiocitos tratados con ouabaína.

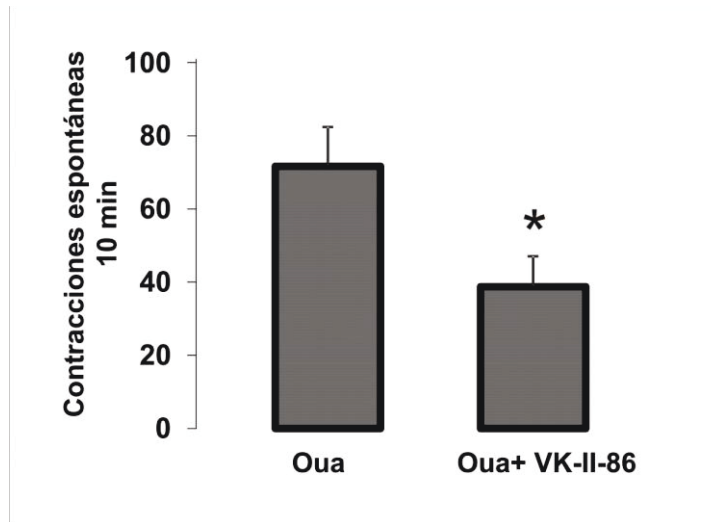


Figura 33: Datos promedio que muestran el efecto de 20 minutos de tratamiento con 50 μ M de ouabaína (n= 16) u ouabaína + 1 μ M de VK-II-86 (n= 16) sobre el total de CE que desarrollan los miocitos ventriculares de rata durante los 10 minutos finales post-tratamiento. * indica $p < 0.05$

Estos resultados sugieren que la estabilización de los RyR₂ podría ser una estrategia terapéutica capaz de prevenir la aparición de arritmias durante la intoxicación digitálica.

Discusión

I. Aspectos generales

Los Digitálicos o Glucósidos Cardiotónicos han sido utilizados durante más de 200 años en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y en el manejo del ritmo cardíaco de pacientes con fibrilación auricular (Gheorghide M. Circulation 2004). Actualmente su utilización clínica es limitada debido, entre otras causas, a la complicación que supone utilizar una estrategia terapéutica capaz de desencadenar arritmias potencialmente fatales.

La inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa (NKA) deriva en una alteración en la homeostasis del Na^+ y el Ca^{++} que promueve un aumento en el contenido de Ca^{++} del RS y en la amplitud de los transitorios de Ca^{++} . Este aumento en el contenido de Ca^{++} del RS explica el efecto inotrópico positivo y ha sido clásicamente considerado como causal de arritmias en corazones tratados con digitálicos, asumiendo que el efecto inotrópico y arritmogénico son manifestaciones de un mismo mecanismo celular. Bajo esta concepción, parecería difícil prevenir el desarrollo de arritmias sin afectar la respuesta inotrópica. Resulta entonces de interés determinar si existe algún evento gatillado a nivel celular durante la administración de digitálicos, que cumpla un rol determinante en el mecanismo arritmogénico sin ser imprescindible para alcanzar una respuesta inotrópica adecuada.

En este trabajo de tesis, nos basamos en la hipótesis de que el tratamiento con digitálicos promueve la activación de CaMKII en el corazón, y evaluamos la importancia que dicha activación tiene en el desarrollo del efecto inotrópico positivo y en la descarga arritmogénica de Ca^{++} . Los resultados presentados comprueban que el tratamiento agudo con una dosis alta de ouabaína es capaz de activar a CaMKII, demostrando que su activación incrementa significativamente la probabilidad de descargas arritmogénicas de Ca^{++} del RS a nivel celular, y arritmias ventriculares en un modelo *In Vivo*. Demostramos además que la inhibición de CaMKII es una estrategia efectiva para prevenir estas arritmias, que no impacta en la respuesta inotrópica al tratamiento con ouabaína. Estos resultados advierten sobre la posibilidad de realizar tratamientos combinados, que sumen la eficacia inotrópica de los digitálicos y la inhibición de CaMKII para mejorar la función contráctil sin aumentar el riesgo de arritmias potencialmente fatales.

En cuanto al mecanismo arritmogénico iniciado por la activación de CaMKII, demostramos su capacidad para fosforilar proteínas implicadas en el manejo del Ca^{++} a nivel del RS y el papel clave que juega la fosforilación de los RyR_2 , ya que se asocia con un incremento en la liberación de ondas arritmogénicas de Ca^{++} . Resulta importante considerar que este aumento en la frecuencia de ondas de Ca^{++} , y la posibilidad de prevenirlo con inhibidores de la activación de CaMKII, fue comprobado no solo durante la administración de

ouabaína sino también con la administración aguda de dosis altas de digoxina, que es la droga utilizada en la práctica clínica.

Finalmente, considerando la importancia que tiene la alteración funcional de los RyR₂ en el mecanismo arritmogénico descrito, y que reportes recientes señalan que el carvedilol y moléculas relacionadas comparten la capacidad de estabilizar la apertura de los RyR₂ (Zhou Q. Nat Med 2011), pusimos a prueba la eficacia de estos compuestos para prevenir el aumento en la frecuencia de ondas de Ca⁺⁺ que experimentan los cardiomiocitos tratados con altas dosis de ouabaína. Los resultados obtenidos indican que tanto la utilización de carvedilol como de su análogo estructural no β-bloqueante (VK-II-86), previenen el aumento en la frecuencia de ondas de Ca⁺⁺ que constituye un indicador arritmogénico en cardiomiocitos tratados con ouabaína.

II. Activación de CaMKII durante el tratamiento con Digitálicos.

Resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación demostraron que los digitálicos son capaces de promover la activación de CaMKII en cardiomiocitos cultivados durante 24 horas en presencia de ouabaína 2 μM (Sapia L. J Mol Cell Cardiol 2010); los presentados en la presente tesis son los primeros en demostrar que el tratamiento agudo con 50 μM de ouabaína es capaz de promover la activación de CaMKII. Esto fue evidenciado por un aumento en la autofosforilación de CaMKII, considerada como indicador de su activación, y por un aumento en la fosforilación de los RyR₂ en Ser-2814 y PLB en Thr-17. Tanto la autofosforilación de CaMKII como la fosforilación de sus blancos proteicos en el RS se mostraron sensibles a la inhibición farmacológica de CaMKII, confirmando que el tratamiento con ouabaína promueve la activación de esta quinasa (figuras 12, 21A y 24).

El estado de activación de CaMKII durante el tratamiento con digitálicos ha sido evaluado por otros grupos de investigación en el mismo período en el que los datos aquí presentados fueron obtenidos y divulgados. De ellos Sacherer y colaboradores (Sacherer M. Br J Pharmacol 2012) han reportado que el nivel de autofosforilación de CaMKII luego de 7 minutos de tratamiento con digitálicos no se encuentra incrementado. En este caso consideramos que el tiempo de tratamiento u otras condiciones experimentales podrían explicar la diferencia con respecto a nuestros resultados.

Por otra parte, el grupo de Ho y colaboradores publicó en el año 2011 un artículo en el cual los autores no encontraron incrementada la actividad de CaMKII y adjudicaron un

papel arritmogénico a las especies reactivas del oxígeno (ROS), postulando que la oxidación directa de los RyR₂ sería el evento clave del proceso arritmogénico activado por los digitálicos a nivel celular (Ho HT. *J Physiol* 2011). Sin embargo, el mismo grupo publicó un artículo muy reciente mostrando que efectivamente existe un aumento en la actividad de CaMKII durante el tratamiento con Digitoxina, y que la activación de CaMKII es promovida por la oxidación de esta quinasa a cargo de especies reactivas del oxígeno (Ho HT. *Cardiovasc Res* 2014).

Nuestra hipótesis inicial asumió que los digitálicos, al aumentar la disponibilidad de Ca⁺⁺ intracelular, podrían activar a CaMKII por el mecanismo clásico (dependiente de Ca⁺⁺). En este sentido resultan interesantes los resultados obtenidos por Ho y colaboradores, en los que al tratar con Digitoxina a ratones que no expresan a la enzima productora de ROS NADPH oxidasa 2 (NOX2-KO), no registraron un incremento en la actividad de CaMKII. Sin embargo, estos ratones mostraron una respuesta inotrópica significativamente menor a la exhibida por su grupo control, dejando abierta la posibilidad de que la ausencia de activación de CaMKII durante el tratamiento con digitoxina se deba en realidad a un mecanismo dependiente de Ca⁺⁺. En efecto, la relación entre la sobrecarga intracelular de Ca⁺⁺ y el desarrollo de alteraciones arritmogénicas en el manejo de Ca⁺⁺ ha sido previamente establecida en un trabajo que muestra que bloquear el modo reverso del NCX previene estas alteraciones arritmogénicas en el manejo del Ca⁺⁺ intracelular (Sato H. *Circulation* 2000). La presente tesis se realizó asumiendo que durante el tratamiento con digitálicos el aumento en la disponibilidad de Ca⁺⁺ citosólico es suficiente para permitir la activación de CaMKII, aunque no descartamos la existencia de otros mecanismos que promuevan en forma redundante la actividad de esta quinasa.

III. Mecanismo por el cual CaMKII promueve arritmias.

III.a. Integración del mecanismo arritmogénico estudiado en cardiomiocitos dentro de la escala tisular.

Para comprender cómo la activación de CaMKII puede desencadenar arritmias mediante la generación de liberaciones espontáneas de Ca⁺⁺, resulta conveniente integrar los niveles molecular, celular y tisular en un modelo fisiopatológico común. Como primer paso es preciso considerar que un aumento en la concentración citosólica de Ca⁺⁺ durante el período diastólico, como el que genera una onda de Ca⁺⁺, despolariza el potencial de membrana de los cardiomiocitos debido a la extrusión electrogénica de Ca⁺⁺ mediada por el NCX. En segundo término, una alteración arritmogénica intracelular sólo será capaz de

alterar el ritmo cardíaco si promueve un cambio en el potencial de membrana que pueda propagarse al tejido circundante.

Tal como fue descrito previamente, el mecanismo propuesto como iniciador de arritmias durante la administración de digitálicos es la ocurrencia de actividad gatillada por DADs. Estas últimas son consecuencia de la descarga diastólica de Ca^{++} desde el RS, que deriva en la extrusión electrogénica de Ca^{++} en intercambio con Na^+ (Schlotthauer K. *Circ Res* 2000). El punto de origen de estas DADs puede ser un grupo de cardiomiocitos ventriculares que coincidiendo en la liberación espontánea de Ca^{++} conformen un foco ectópico, o pueden ser de células de Purkinje, capaces de dar lugar a un subtipo característico de taquiarritmia ventricular conocido como taquicardia ventricular bidireccional (Weiss J. *Heart Rhythm* 2011).

En el miocardio ventricular cada miocito se encuentra acoplado mediante uniones GAP a un promedio de 11 miocitos adyacentes (Hoyt RH. *Circ Res* 1989; Peters NS. *Circulation* 1998); esto hace que cualquier cambio sub-umbral en el potencial de membrana de un miocito aislado pueda ser contrarrestado por el flujo de corriente iónica a través de las uniones GAP debido a la diferencia de potencial que se genera entre la célula en cuestión y las adyacentes. Este fenómeno permite comprender que si una onda de Ca^{++} ocurre en un miocito aislado, la DAD originada difícilmente sea capaz de propagar a escala tisular. Sin embargo, es posible que ocurra la liberación sincrónica de Ca^{++} en un conjunto de miocitos, de modo que la corriente despolarizante generada por la extrusión de estas moléculas de Ca^{++} alcance magnitud suficiente para disparar un potencial de acción (Fujiwara K. *Circ Res* 2008; Xie Y. *Biophys J* 2010).

Considerando este tipo de fenómenos derivados de la interacción entre células, podemos comprender que la ocurrencia de una onda de Ca^{++} /DADs en un cardiomiocito no necesariamente condiciona la aparición de arritmias, sino que es un factor predisponente cuya frecuencia determina el riesgo de aparición de focos ectópicos de descarga.

III.b. Fosforilaciones mediadas por CaMKII y generación de ondas arritmogénicas de Ca^{++} a nivel celular.

La importancia que tiene la actividad de CaMKII en la inducción de arritmias durante el tratamiento con digitálicos fue demostrada en esta tesis mediante estrategias farmacológicas y no farmacológicas. Así como la utilización de KN-93 resultó efectiva para reducir la frecuencia de contracciones espontáneas, el mismo resultado fue obtenido utilizando un inhibidor no relacionado estructuralmente (AIP). En paralelo, se descartaron

posibles efectos inespecíficos del KN-93 utilizando un análogo estructural (KN-92) que no comparte su capacidad de inhibir a CaMKII, el cual no fue capaz de reproducir el efecto antiarritmogénico observado con KN-93.

Adicionalmente, confirmamos mediante un método no farmacológico la importancia de la activación de CaMKII en el proceso arritmogénico estudiado, ya que contabilizamos una menor frecuencia de contracciones espontáneas en cardiomiocitos aislados de ratones que expresan el péptido inhibidor específico (AIP) anclado a nivel del RS, lo que adicionalmente sugiere que el o los blancos de CaMKII cuya fosforilación resulta proarritmogénica se encuentra en el entorno del RS.

En segundo término, para profundizar en el mecanismo por el cual CaMKII promueve la descarga arritmogénica de Ca^{++} desde el RS hacia el citosol, tuvimos en cuenta que la frecuencia con la que ocurre este fenómeno depende de: el contenido de Ca^{++} luminal a nivel del RS (Shannon TR. *Circ Res* 2002) y la probabilidad de apertura de los RyR₂ (Stokke MK. *Cardiovasc Res* 2011).

La activación de CaMKII ha sido relacionada con la aparición de arritmias gatilladas por DADs mediante la fosforilación del residuo Ser-2814 en los RyR₂, que disminuye el umbral para la liberación espontánea de Ca^{++} del RS (van Oort. *Circulation* 2010). Pero también la actividad de CaMKII puede aumentar el contenido de Ca^{++} dentro del RS al fosforilar a PLB, la cual deja así de inhibir a SERCA, permitiendo que aumente el secuestro de Ca^{++} hacia el lumen del RS. Este mecanismo ha sido demostrado durante la recuperación de una acidosis intracelular, en la que CaMKII promueve DADs mediante la fosforilación de fosfolamban en Thr17, favoreciendo el secuestro de Ca^{++} mediado por SERCA y aumentando el contenido de Ca^{++} dentro del RS (Said M. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008).

La activación de CaMKII durante la administración de digitálicos podría promover la descarga espontánea de Ca^{++} del RS como consecuencia de la fosforilación de los RyR₂ en Ser-2814, o por fosforilaciones que promuevan un aumento en el contenido de Ca^{++} dentro de esta organela. Entre estas últimas la principal posibilidad sería la fosforilación en Thr-17 de PLB (Mattiuzzi A. *Heart Rhythm* 2011), aunque también la fosforilación de los canales de Ca^{++} tipo L es capaz de conducir a la sobrecarga del RS (Chen X. *Circ Res* 2005).

Nuestros datos muestran que los digitálicos aumentan tanto el contenido de Ca^{++} en el RS como la fosforilación del RyR₂. Sin embargo la inhibición de CaMKII redujo el nivel de fosforilación del RyR₂ en Ser-2814 y la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{++} sin afectar el contenido de Ca^{++} en el RS, sugiriendo que CaMKII promueve un aumento en la liberación

espontánea de Ca^{++} mediante la fosforilación de los RyR_2 ; y que el aumento en el contenido de Ca^{++} dentro del RS no es suficiente para promover arritmias.

De todos modos, es reconocido que no alcanza sólo con el aumento en la probabilidad de apertura de los RyR_2 para que se produzca la fuga espontánea de Ca^{++} desde el RS hacia el citosol, sino que el contenido de Ca^{++} del RS debe alcanzar un nivel mínimo o umbral (Venetucci LA. *Circ Res*.2007). Durante el tratamiento con digitálicos este nivel umbral es alcanzado independientemente de la actividad de CaMKII, ya que a pesar de prevenir la fosforilación de PLB, la inhibición de CaMKII no afectó el grado de aumento en el contenido de Ca^{++} del RS producido por el tratamiento con ouabaína. Estos resultados sugieren que el aumento del contenido de Ca^{++} dentro del RS no depende de la activación de CaMKII, y teniendo en cuenta que solo el 40 % de la actividad de SERCA es regulada por PLB (Brittsan AG. *J Biol Chem* 2000) se puede considerar que el incremento en la disponibilidad de Ca^{++} citosólico, promovido por inhibición de la NKA con digitálicos, resulta suficiente para aumentar el ingreso de Ca^{++} al RS.

Resulta consistente con estas observaciones la conservación de la respuesta inotrópica en miocitos PLB-DM, dado que en estas células no es posible que CaMKII fosforile a PLB y estimule la carga de Ca^{++} del RS. En estos cardiomiocitos, el tratamiento con ouabaína también promovió la ocurrencia de ondas de Ca^{++} , demostrando que este efecto arritmogénico no requiere que CaMKII fosforile a PLB.

Finalmente, si consideramos que aún con la inhibición de CaMKII, tanto el aumento en el contenido de Ca^{++} del RS como la respuesta inotrópica al tratamiento con ouabaína/digoxina se encuentran conservados (figuras 15, 16, 21B y 27), podemos inferir que el efecto antiarrítmico logrado con la inhibición de CaMKII no depende de un menor ingreso de Ca^{++} desde el espacio extracelular, como el que podría esperarse si la inhibición de esta quinasa redujera el ingreso de Ca^{++} a través de los canales tipo L del sarcolema (Koval O. *Proc Natl Acad Sci* 2010).

III.c. La fosforilación de los RyR_2 en el residuo Ser-2814 es clave en el proceso arritmogénico desencadenado por los digitálicos.

Como fue mencionado previamente, los RyR_2 son complejos proteicos susceptibles de recibir modificaciones postraduccionales, tales como la fosforilación y la oxidación, ambas capaces de incrementar su probabilidad de apertura (Wehrens XH. *Circ Res* 2004; Prosser B. *Science* 2011). En paralelo con la divulgación parcial de resultados incluidos en esta tesis,

proponiendo a la fosforilación del residuo Ser-2814 como alteración clave en la función de los RyR₂ durante la administración de digitálicos (Gonano L. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011), Ho y colaboradores publicaron un artículo señalando que el tratamiento agudo con dosis arritmogénicas de digitoxina cursa con un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno que promueven la oxidación de los RyR₂ (Ho HT. *J Physiol* 2011). Dado que el tratamiento con moléculas antioxidantes resultó efectivo para prevenir la generación de ondas de Ca⁺⁺ en estas células, los autores consideraron a la oxidación de los RyR₂ como el mecanismo arritmogénico activado por los digitálicos. Al discutir sus resultados, refirieron haber estudiado el grado de activación de CaMKII sin haber encontrado un aumento en la actividad de esta quinasa tras 30 minutos de tratamiento con una dosis arritmogénica de digitoxina (100 nM).

Sin embargo, una publicación reciente del mismo grupo parece resolver las discrepancias generadas entre nuestros resultados y los obtenidos en su primer trabajo. En este caso proponen que las especies reactivas del oxígeno generadas durante el tratamiento con digitoxina, promueven la activación de CaMKII mediante la oxidación del residuo Met-287, y le asignan un rol clave a la activación de esta quinasa en la inducción de ondas de Ca⁺⁺ (Ho HT. *Cardiovasc Res* 2014). Un aporte contundente de este trabajo deriva de la utilización de ratones transgénicos que poseen una mutación en la posición 2814 de los RyR₂ (2814A), en la cual el residuo Serina (susceptible de ser fosforilado) se encuentra reemplazado por Alanina (no fosforilable). Interesantemente, el tratamiento con digitoxina no fue capaz de aumentar la frecuencia de ondas arritmogénicas de Ca⁺⁺ en estas células a pesar de promover un incremento en la actividad de CaMKII y en la oxidación de los RyR₂. Estos resultados confirman que dentro del espectro de blancos proteicos de CaMKII, los RyR₂ constituyen un blanco fundamental afectado durante el tratamiento con digitálicos, y que su fosforilación es un paso necesario sin el cual las especies reactivas del oxígeno no activan el mecanismo arritmogénico.

IV. Posible papel desempeñado por las mitocondrias en las arritmias inducidas por digitálicos.

Las mitocondrias son organelas que afectan el manejo del Ca⁺⁺ intracelular y también podrían contribuir al desarrollo de alteraciones arritmogénicas. Tal como se describió previamente, el Ca⁺⁺ ingresa a la matriz mitocondrial principalmente a través del MCU, mientras que su salida hacia el citosol depende de su intercambio con Na⁺ mediado por el mNCX. La captación mitocondrial de Ca⁺⁺ mediada por el MCU permite que se produzca un mayor ingreso del mismo a la matriz mitocondrial cuando aumenta el ciclado de Ca⁺⁺

intracelular, tal como ocurre durante la estimulación adrenérgica (Kohlhaas M. *Circulation* 2010).

La concentración de este ión dentro de la matriz mitocondrial condiciona la capacidad de producir ATP, ya que la actividad de diversas enzimas del ciclo de Krebs es dependiente de Ca^{++} (Di Benedetto G. *Cell Metab* 2013). De este modo, la producción energética en los cardiomiocitos se adapta a sus necesidades metabólicas, que dependen principalmente del consumo de ATP derivado del ciclado de Ca^{++} y la activación de las proteínas contráctiles.

Recientemente, Joiner y colaboradores han propuesto que CaMKII es capaz de incrementar el ingreso de Ca^{++} a la matriz mitocondrial mediante la fosforilación del MCU (Joiner ML. *Nature* 2012). De esta forma, CaMKII favorecería la adaptación de la producción energética mitocondrial a las necesidades metabólicas de los cardiomiocitos, en contextos en los que el aumento en el ciclado de Ca^{++} impone una demanda incrementada de ATP. Aunque la contundencia de las pruebas experimentales que sugieren al MCU como blanco fosforilable de CaMKII se encuentra actualmente debatida (Fieni F. *Nature* 2014).

Los digitálicos, lejos de incrementar los niveles de Ca^{++} dentro de la matriz mitocondrial los reducen, debido a que la acumulación citosólica de Na^+ favorece la salida de Ca^{++} de la matriz mitocondrial en intercambio de Na^+ a través del mNCX. Este mecanismo propuesto por Liu y colaboradores, conduce a la reducción de la concentración de Ca^{++} y a desajustes en la producción de ATP, que conllevan un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Este grupo le asigna un efecto proarrítmogénico a la liberación de ROS mitocondriales y demuestra que el bloqueo del mNCX resulta efectivo como estrategia antiarrítmica durante la administración de digitálicos (Liu T. *J Mol Cell Cardiol* 2010).

En función de contrastar el efecto antiarrítmico alcanzado por el bloqueo farmacológico del mNCX con nuestros resultados, es necesario considerar que existen diferencias en las condiciones experimentales utilizadas, ya que Liu y colaboradores realizaron un tratamiento con 1 μM de ouabaína + 100 nM de isoproterenol para inducir arritmias en cardiomiocitos de rata. En segundo lugar, es posible especular que, tanto la producción de ROS mitocondriales como la salida de Ca^{++} desde la matriz mitocondrial a través de el mNCX, actúen como activadores de CaMKII y a esto se deba la eficacia antiarrítmica del inhibidor farmacológico del mNCX utilizado en dicho estudio (Liu T. *J Mol Cell Cardiol* 2010).

V. La actividad de CaMKII no es necesaria para alcanzar una respuesta inotrópica adecuada.

Dado que CaMKII fosforila a diversas proteínas implicadas en el manejo del Ca^{++} intracelular, resultaría posible que su activación actúe como promotor del efecto inotrópico positivo causado por los digitálicos. Entre las razones para esperar posibles cambios en la magnitud del efecto inotrópico positivo, cuenta el efecto que la fosforilación de los canales de Ca^{++} tipo L o de PLB podría tener sobre el contenido de Ca^{++} del RS. De hecho, se ha demostrado que ambas fosforilaciones logran aumentar dicho contenido, ya sea incrementando el ingreso de Ca^{++} desde el espacio extracelular o acelerando la retoma de Ca^{++} hacia el RS en diástole respectivamente (Koval O. Proc Natl Acad Sci 2010; Mattiazzi A. Heart Rhythm 2011). Sin embargo, nuestros resultados indican que la inhibición de CaMKII no afecta significativamente la magnitud con la que el contenido de Ca^{++} del RS aumenta durante el tratamiento con ouabaína/digoxina.

Por su parte, la fosforilación de los RyR_2 en Ser-2814 es capaz de aumentar la eficacia del AEC (apertura de los RyR_2 en respuesta al ingreso de Ca^{++} extracelular), tal como ocurre durante el marcapaseo a alta frecuencia (Kushnir A. Proc Natl Acad Sci 2010) o la estimulación β -adrenérgica (Ferrero P. J Mol Cel Cardiol 2007). Sin embargo, esta fosforilación puede también aumentar la pérdida de Ca^{++} desde el RS hacia el citosol durante el período diastólico y de este modo reducir el contenido de Ca^{++} del RS, contrarrestando el efecto anterior (Maier L. Cardiovasc Res 2007). Un ejemplo de este balance ha sido demostrado durante la sobreexpresión de CaMKII, que cursa con una reducción del contenido de Ca^{++} del RS, sin alteración en la amplitud de los transitorios de Ca^{++} (Maier L. Circ Res 2003; Kohlhaas M. Circ Res 2006).

En este contexto nuestros resultados indican que la inhibición de CaMKII no afectó la magnitud del efecto inotrópico positivo alcanzado durante el tratamiento agudo con altas concentraciones de ouabaína, tanto en miocitos de rata tratados con un inhibidor farmacológico de CaMKII, como en miocitos de ratones SR-AIP. Por su parte, la sobreexpresión de CaMKII tampoco alteró la magnitud de la respuesta inotrópica alcanzada durante el tratamiento con ouabaína.

En conjunto, consideramos que el desarrollo del efecto inotrópico positivo durante el tratamiento de los cardiomiocitos con digitálicos deriva del aumento en la disponibilidad de Ca^{++} intracelular, que depende de la alteración funcional del NCX (Altamirano J. J Physiol 2006). En estas condiciones, el ciclado del Ca^{++} dentro de los cardiomiocitos encuentra un estado de equilibrio, caracterizado por un aumento en el contenido de Ca^{++} del RS y en la amplitud de los transitorios de Ca^{++} , que no está atado al grado de actividad de CaMKII.

En coincidencia, Ho y colaboradores tampoco encontraron diferencias dependientes de la inhibición de CaMKII en la magnitud de respuesta inotrópica registrada en cardiomiocitos de rata tratados con digitoxina 100 nM (Ho HT. Cardiovasc Res 2014).

Resulta interesante que la inhibición de CaMKII sea capaz de prevenir la descarga arritmogénica de Ca^{++} durante el tratamiento con digitálicos sin interferir con el efecto inotrópico buscado, ya que permite pensar en la inhibición de esta quinasa como potencial estrategia antiarrítmica capaz de ampliar la ventana terapéutica de los digitálicos.

VI. La activación de CaMKII cumple un papel determinante en el desarrollo de arritmias letales por intoxicación digitálica aguda.

Para determinar la existencia de un correlato entre los hallazgos realizados en cardiomiocitos aislados y el riesgo de aparición de arritmias *In Vivo*, evaluamos la importancia de la activación de CaMKII en un modelo murino de intoxicación digitálica aguda, basado en la administración intraperitoneal de ouabaína. Al momento de elegir la dosis de ouabaína, decidimos administrar 10 mg/kg por vía intraperitoneal dado que la dosis aceptada como Dosis Letal 50 (DL50, aquella con la que se espera un 50 % de mortalidad) en ratones es de 11 mg/kg (Proceedings of the Society for Experimental Biology 1965).

Tal como fue presentado en la tabla 2, la inhibición de CaMKII se asoció con una menor incidencia de episodios arrítmicos, y con una reducción en la mortalidad promovida por el tratamiento con ouabaína. Estos resultados demuestran que existe un correlato entre los hallazgos funcionales realizados en cardiomiocitos aislados, el patrón de fosforilaciones encontradas en corazones perfundidos y la importancia de la actividad de CaMKII durante la intoxicación digitálica *In Vivo*.

VII. Estabilización de los RyR₂ como alternativa terapéutica para prevenir las arritmias inducidas por digitálicos.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que la CaMKII desempeña un papel clave en el proceso arritmogénico desencadenado por los digitálicos, y que la inhibición de esta quinasa podría resultar una estrategia antiarrítmica efectiva en cuadros de intoxicación digitálica. Sin embargo, la inhibición de CaMKII no constituye una estrategia disponible actualmente como recurso terapéutico en humanos, y aún existen desafíos a

sortear en este sentido. Dada la distribución ubicua de CaMKII en distintos tejidos, será necesario el desarrollo de técnicas de inhibición cardio-específica de esta quinasa (Pellicena P. *Front Pharmacol* 2014). Conjuntamente, la inhibición de su actividad sobre determinadas proteínas de los cardiomiocitos podría no ser beneficiosa, teniendo en cuenta que la fosforilación de PLB constituye un evento clave en distintas situaciones fisiológicas (Mattiuzzi A. *Cardiovasc Res* 2007; Vittone L. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1990).

Teniendo en cuenta estas dificultades en torno a la inhibición de CaMKII y dada la importancia que cobra la fosforilación de los RyR₂ en Ser-2814, consideramos de interés evaluar la utilidad de la estabilización farmacológica de los RyR₂ para prevenir el aumento en la pérdida diastólica de Ca⁺⁺ del RS en miocitos tratados con una dosis arritmogénica de ouabaína.

En los últimos 10 años se ha comenzado a estudiar la utilización de distintas moléculas capaces de interactuar con los RyR₂, que logren reducir la fuga espontánea de Ca⁺⁺ del RS en diástole y así prevenir la aparición de arritmias causadas por este mecanismo (Wehrens XH. *Science* 2004; Venetucci LA. *Circ Res* 2006; Maxwell JT. *Am J Physiol* 2012).

Uno de los compuestos más estudiados con este propósito ha sido el JTV-519, el cual fue utilizado incluso durante la administración aguda de ouabaína por Sacherer y colaboradores. Este grupo observó que, aunque resultó efectivo para reducir la frecuencia de ondas de Ca⁺⁺, el tratamiento con JTV-519 redujo significativamente la respuesta inotrópica de los cardiomiocitos al tratamiento con ouabaína (Sacherer M. *Br J Pharmacol* 2012).

Paralelamente, el grupo liderado por el doctor Wayne Chen (Universidad de Calgary, Canada) ha demostrado que el Carvedilol, fármaco utilizado actualmente debido a su capacidad para bloquear a los receptores β-adrenérgicos, posee también la capacidad de unirse a los RyR₂ y reducir el tiempo de apertura de estos canales (Zhou Q. *Nat Med* 2011). Estas propiedades le confieren la capacidad de prevenir el desarrollo de arritmias asociadas a sobrecarga intracelular de Ca⁺⁺, y son compartidas por un análogo estructural que no posee actividad β-bloqueante (VK-II-86).

En la presente tesis, se demostró que tanto la utilización de Carvedilol como de VK-II-86 resultan efectivas para prevenir el aumento en la frecuencia de ondas de Ca⁺⁺ promovido por el tratamiento con ouabaína en dosis arritmogénicas. En nuestros experimentos, en los que cardiomiocitos de rata fueron tratados durante 30 minutos con 50 μM de ouabaína, la estabilización de los RyR₂ se logró aún a pesar de que estos se encuentran fosforilados por CaMKII. Este aspecto resulta remarcable ya que Sacherer y colaboradores

no detectaron activación de CaMKII en su modelo de tratamiento con ouabaína durante 7 minutos (Sacherer M. Br J Pharmacol 2012).

Por otro lado, al evaluar el aumento en la amplitud de acortamiento celular producido en respuesta al tratamiento con ouabaína, encontramos una reducción en la magnitud de respuesta inotrópica provocada por el tratamiento con carvedilol, mientras que no se observaron modificaciones derivadas de la utilización de VK-II-86. El mecanismo por el cual el tratamiento con carvedilol afectó la respuesta inotrópica de los cardiomiocitos a la ouabaína no ha sido evaluado aún, aunque existen reportes que muestran que el carvedilol en concentraciones superiores a 0,3 μM es capaz de reducir la corriente de Ca^{++} (ICa^{++}) (Cheng J. Eur J Pharmacol 1999). Del mismo modo, Sacherer y colaboradores demostraron que la reducción en la respuesta inotrópica a la ouabaína hallada en miocitos tratados con JTV-519 se debe a una reducción en ICa^{++} provocada por esta última droga (Sacherer M. Br J Pharmacol 2012).

Estos resultados sugieren que la utilización de VK-II-86 podría resultar viable como estrategia antiarrítmica durante la administración de digitálicos, ya que a diferencia del carvedilol este compuesto podría utilizarse sin generar efectos colaterales derivados del bloqueo β -adrenérgico.

En conjunto, la utilización de nuevas moléculas capaces de estabilizar la apertura de los RyR_2 requiere mayor estudio. En lo inmediato, nuestro grupo de trabajo se propone determinar los efectos del carvedilol y su análogo estructural sobre la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{++} en cardiomiocitos tratados con ouabaína/digoxina. Conjuntamente, surge la necesidad de realizar el seguimiento electrocardiográfico en ratones tratados con ouabaína IP, para poner a prueba el potencial antiarrítmico de estas moléculas.

VIII. Conclusiones y Aplicaciones potenciales de los resultados obtenidos.

Los resultados presentados en esta tesis indican que:

-La administración de ouabaina en dosis proarritmogénicas es capaz de activar a CaMKII.

-La actividad de esta quinasa se asocia al desarrollo de un perfil arritmogénico en los cardiomiocitos tratados con ouabaína o digoxina, caracterizado por un aumento en la pérdida de Ca^{++} del RS hacia el citosol. En este contexto, la actividad de esta quinasa

media la fosforilación de PLB y RyR₂, ambas proteínas involucradas en el ciclado de Ca⁺⁺ en el RS.

-El tratamiento con digitálicos promueve un aumento en el contenido de Ca⁺⁺ del RS, que no resulta dependiente de la fosforilación de PLB. Sin embargo, tal como lo remarca el esquema de la figura 34, la fosforilación de los RyR₂ conduce a un aumento en la liberación espontánea de Ca⁺⁺ desde el RS, y constituye el suceso clave por el que se incrementa la probabilidad de arritmias durante la administración de digitálicos.

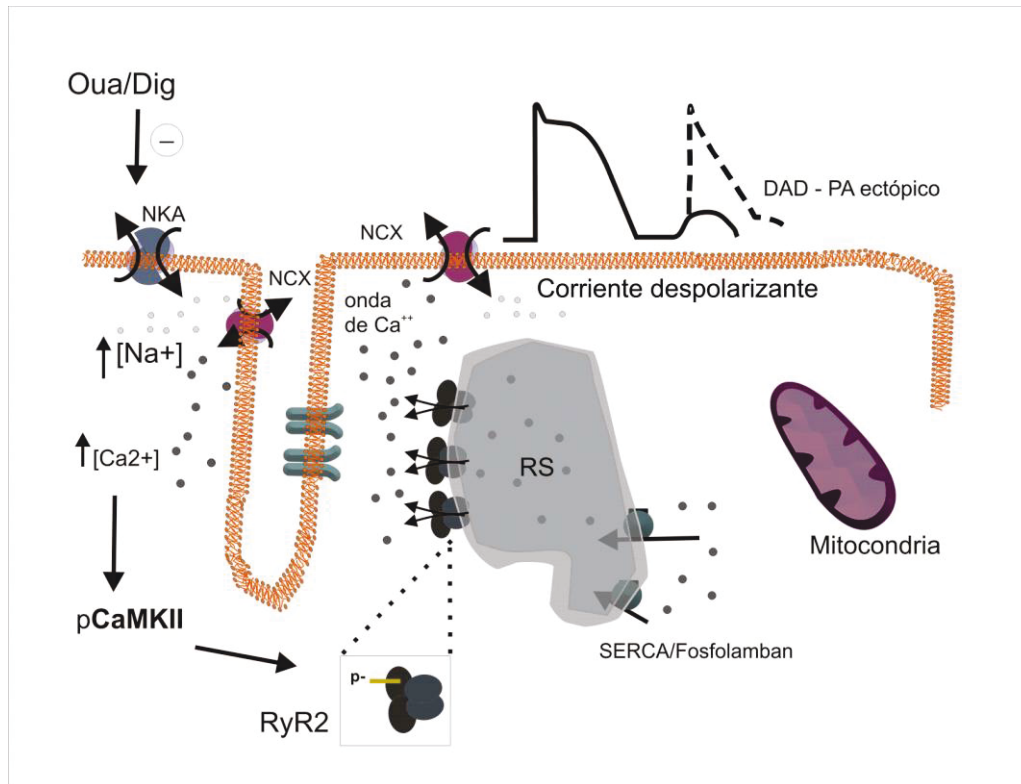


Figura 34: Esquema que resume la secuencia de eventos que relacionan a la activación de CaMKII con la generación de ondas de Ca⁺⁺ y DADs durante la administración de digitálicos.

-La inhibición de la activación de CaMKII resulta efectiva como estrategia antiarrítmica en un modelo *In Vivo* de cardiotoxicidad digitálica aguda.

-La estabilización de los RyR₂ con VK-II-86 permiten reducir el aumento en la frecuencia de ondas de Ca⁺⁺ inducido por la administración de ouabaína, sugiriendo que podrían resultar una estrategia efectiva para estabilizar la apertura de los RyR₂ y prevenir el desarrollo de arritmias durante la administración de digitálicos.

En conjunto, considero que los resultados obtenidos en la presente tesis mejoran el grado de entendimiento del mecanismo arritmogénico activado por los digitálicos y podrían ser aplicados en la prevención de las arritmias gatilladas por estos compuestos. Paralelamente, pueden aportar información importante acerca de los mecanismos involucrados en diversas condiciones patológicas que cursan con una disrupción del manejo del Ca^{++} intracelular por los miocitos cardíacos.

IX. Limitaciones y perspectivas a futuro.

IX.a. Limitaciones: Posible efecto dependiente de CaMKII sobre la corriente de Ca^{++} .

Los experimentos realizados en esta tesis se han enfocado en la determinación de los efectos que la activación de CaMKII tiene sobre los sustratos descritos en el RS, tanto PLB como los RyR_2 . Sin embargo, ha sido demostrado que CaMKII es capaz de fosforilar a los canales de Ca^{++} tipo L de los cardiomiocitos, promoviendo el funcionamiento de estos canales en un modo que en inglés se denomina “Gating Mode” y se caracteriza por aperturas prolongadas de los mismos (Dzhura. *Nature Cell Biology* 2000). En conjunto, el aumento en el pico y el retraso en la inactivación de ICa^{++} promovido por esta fosforilación se denomina “Facilitación” (Bers DM. *Front Pharmacol.* 2014).

Si la activación de CaMKII durante la administración de digitálicos estuviera promoviendo la fosforilación de los canales de Ca^{++} , sería esperable el desarrollo de EADs, ya que el aumento de ICa^{++} es la causa más reconocida como iniciadora de EADs (Wu Y. *Am J Physiol* 1999; Tanskanen A. *Biophys J* 2005). Hasta el momento nuestro grupo de trabajo no ha encontrado reportes que describan la ocurrencia de EADs como un mecanismo involucrado en la génesis de arritmias durante la administración de digitálicos, por lo que consideramos que este potencial mecanismo merece ser evaluado.

De todos modos, actualmente se acepta que la descarga de Ca^{++} del RS también puede causar EADs (Nemec J. *Heart Rhythm* 2010; Terentyev D. *Circ Res.* 2014) mediante un mecanismo que implica la extrusión de Ca^{++} mediada por el NCX que, ocurriendo durante la meseta del potencial de acción, aporta una corriente despolarizante capaz de alargar dicha fase de meseta y permitir la reactivación de la corriente de Ca^{++} . En este contexto, la descarga espontánea de Ca^{++} del RS hacia el citosol fue evaluada considerandola un evento celular capaz de desencadenar arritmias por múltiples mecanismos durante el tratamiento con digitálicos.

Si la activación de CaMKII tuviera consecuencias funcionales derivadas de su efecto sobre ICa^{++} , cabría esperar diferencias en el contenido de Ca^{++} del RS y en la magnitud de respuesta inotrópica, sin embargo no observamos tales diferencias. Conjuntamente, existe la posibilidad de que la activación de CaMKII promueva la aparición de EADs por su efecto directo sobre la corriente de Ca^{++} . Aunque resulta un punto interesante a investigar, este mecanismo arritmogénico parece probable en un contexto de alargamiento del PA, y en este sentido diversos estudios reportan que el tratamiento con digitálicos cursa con un acortamiento del PA (Lauten A. Cor Vasa 1987; Saner HE. Clin Cardiol 1988; Guo L. Cell Physiol Biochem. 2011). Aún así es posible que, en forma aleatoria, ocurran cambios en la duración de los PA dependientes de la activación de corrientes despolarizantes activadas por la descarga intracelular de Ca^{++} en fases tempranas del PA, lo que podría llevar al desarrollo de EADs.

De todos modos, la posible generación de arritmias gatilladas por EADs durante los experimentos realizados *In Vivo* requiere mayor evaluación.

IX.b. Experimentos futuros.

-Registro de potenciales de acción en cardiomiocitos tratados con digitálicos, para evaluar la posibilidad de aparición de EADs más allá de las DADs, reconocidas hasta el momento como el subtipo de post-despolarización inducido por digitálicos. En caso de encontrar EADs, pondremos a prueba la eficacia de los estabilizadores del RyR_2 para prevenirlas y abordaremos el registro de la corriente de Ca^{++} durante la administración de digitálicos en ausencia y en presencia de KN-93, carvedilol o VK-II-86. Estos experimentos nos permitirían discernir si las EADs dependen de un aumento en la corriente de Ca^{++} promovido por CaMKII o si son otra de las manifestaciones promovidas por la pérdida espontánea de Ca^{++} del RS (que en este caso estaría ocurriendo durante la meseta del PA).

-Generación de un modelo de intoxicación digitálica que implique la administración crónica de digoxina en dosis terapéuticas, con la posibilidad de aplicar dosis “inductoras” de arritmias a la semana de tratamiento. Este modelo requerirá de dispositivos de administración tales como bombas osmóticas, y nos permitiría evaluar la eficacia antiarrítmica del co-tratamiento con KN-93, carvedilol y VK-II-86.

Referencias bibliográficas.

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, and Pogwizd SM. Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase modulates RyR2 phosphorylation and SR Ca^{2+} leak in a rabbit heart failure. *Circ Res* 2005. 97: 1314–1322.

Alseikhan B.A., DeMaria C.D., Colecraft H.M., Yue D.T. Engineered calmodulins reveal the unexpected eminence of Ca^{2+} channel inactivation in controlling heart excitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. 99:17185–17190.

Altamirano, J., Li, Y., Desantiago, J., Piacentino, V. III, Houser, S. R., and Bers, D. M. The inotropic effect of cardioactive glycosides in ventricular myocytes requires Na^{+} - Ca^{2+} exchanger function. *J. Physiol* 2006. 575, 845–854.

Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack BA. Multifunctional Ca/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca-induced enhancement of the L-type Ca current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 1994;75:854–61.

Antman EM, Wenger TL, Butler VP, Jr, et al. Treatment of 150 cases of life-threatening digitalis intoxication with digoxin-specific Fab antibody fragments. Final report of a multicenter study. *Circulation* 1990;81:1744–1752.

Bagrov AY, Fedorova OV, Roukoyatkina NI, Zhabko EP. Effect of endogenous digoxin-like factor and digoxin antibody on myocardial Na^{+} , K^{+} -pump activity and ventricular arrhythmias in acute myocardial ischaemia in rats. *Cardiovasc Res*. 1993; 27:1045-50.

Bagrov AY, Shapiro JI. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008; 4:378–92.

Bai Y.; Morgan E. E.; Giovannucci D. R.; Pierre S. V.; Philipson K. D.; Askari A.; Liu L. Different roles of the cardiac Na^{+}/Ca^{2+} -exchanger in ouabain-induced inotropy, cell signaling, and hypertrophy. *Am. J. Physiol* 2013. 304, H427–H435.

Barth E, Stammler G, Speiser B, Schaper J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol*.1992; 24:669–681.

Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM. CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1995; 268:H703–12.

Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF: Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 2004, 85:33–69.

Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*. 1999; 79:1127–1155.

Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers; 2001.

Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 2002; 415: 198–205.

Bers DM. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 2006 21: 380–387.

Bers DM, Morotti S. Ca⁽²⁺⁾ current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences. *Front Pharmacol.* 2014. 17; 5:144.

Bers D. M., Grandi E.. Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2009; 54: 180–187

Bers DM, Guo T. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y AcadSci* 2005; 1047:86–98.

Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004; 37:417–429.

Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 1998. 275:F633-F650.

Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 2005; 57:417–45.

Brehm P., Eckert R. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* 1978; 202:1203–1206.

Brittsan AG, Carr AN, Schmidt AG, Kranias EG. Maximal inhibition of SERCA2 Ca⁽²⁺⁾ affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban. *J Biol Chem* 2000; 275: 12129–12135.

Brittsan AG, Ginsburg KS, Chu G, Yatani A, Wolska BM, Schmidt AG, Asahi M, MacLennan DH, Bers DM, Kranias EG. Chronic SR Ca²⁺-atpase inhibition causes adaptive changes in cellular Ca²⁺ transport. *Circ Res.* 2003; 92:769–776.

Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2131–9.

Chen W, Wang R, Chen B, Zhong X, Kong H, Bai Y, Zhou Q, Xie C, Zhang J, Guo A, Tian X, Jones PP, O'Mara ML, Liu Y, Mi T, Zhang L, Bolstad J, Semeniuk L, Cheng H, Zhang J, Chen J, Tieleman DP, Gillis AM, Duff HJ, Fill M, Song LS, Chen SR. The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca²⁺ waves and Ca²⁺-triggered arrhythmias. *Nat Med.* 2014; 20:184-92.

Chen X, et al. Ca²⁺ influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res.* 2005;97:1009–1017.

Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 1993; 262: 740–744.

Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks and [Ca²⁺]_i waves in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 1996; 270:C148–C159.

Cheng J, Niwa R, Kamiya K, Toyama J, Kodama I. Carvedilol blocks the repolarizing K⁺ currents and the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol.* 1999; 376:189–201.

Clusin WT. Calcium and cardiac arrhythmias: DADs, EADs, and alternans. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003; 40: 337-375.

Curran, J., Brown, K. H., Santiago, D. J., Pogwizd, S., Bers, D. M., and Shannon, T. R. Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010;49, 25–32.

Curran, J., Hinton, M. J., Rios, E., Bers, D. M., and Shannon, T. R. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ. Res.* 2007; 100, 391–398.

Currie S, Loughrey CM, Craig M-A, Smith GL. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem. J.* 2004; 377:357–366.

Dedkova EN, Blatter LA. Calcium signaling in cardiac mitochondria. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 58:125–33.

De Koninck P, et al. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science.* 1998; 279:227-30.

Di Benedetto G, Scalzotto E, Mongillo M and Pozzan T. Mitochondrial Ca⁺⁺ uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell Metab.* 2013; 17, 965–975.

Donoso P, Sánchez G, Bull R, Hidalgo C. Modulation of cardiac ryanodine receptor activity by ROS and RNS. *Front. Biosci.* 2011; 16:553–567.

Dzhura, I., Wu, Y., Colbran, R. J., Balsler, J. R. & Anderson, M. E. Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nature Cell Biology* 2000; 2, 173–177.

Edman CF, Schulman H. Identification and characterization of δ BCaM kinase and δ C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1221:89–101.

Eisner DA, George CH, Smith GL, Trafford AW, Venetucci LA. How does CaMKII δ phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor contribute to inotropy? *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:E123.

Eisner DA, Kashimura T, Venetucci LA, Trafford AW. From the ryanodine receptor to cardiac arrhythmias. *Circ. J.* 2009; 73:1561–67.

Elliott EB, Hasumi H, Otani N, et al. K201 (JTV-519) alters the spatiotemporal properties of diastolic Ca(2+) release and the associated diastolic contraction during beta-adrenergic stimulation in rat ventricular cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol.* 2011; 106(6):1009–1022.

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.

Erickson JR, Pereira L, Wang L, et al. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*. 2013 doi: 10.1038/nature12537.

Fabiato A, Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol*. 1979; 41: 473–484.

Ferrero P, Said M, Sánchez G, Vittone L, Valverde C, Donoso P, Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C. Ca²⁺/Calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during β -adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 43:281-291.

Ferrier GR. Digitalis arrhythmias: role of oscillatory afterpotentials. *Prog Cardiovasc Dis*. 1977; 19:459–474.

Ferrier GR, Moe GK. Effect of calcium on acetylstrophanthidin-induced transient depolarizations in canine Purkinje tissue. *Circ Res*. 1973; 33:508–515.

Fieni, F., Johnson, D. E., Hudmon, A. & Kirichok, Y. Mitochondrial Ca²⁺ uniporter and CaMKII in heart. *Nature* 2014; 513.

Frank KF, Bölck B, Erdmann E, Schwinger RH. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc Res* 2003; 57(1): 20–7.

Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., and Ramesh, V. Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys. J*. 1999; 77, 1528–1539.

Fujiwara K, Tanaka H, Mani H, Nakagami T, Takamatsu T. Burst emergence of intracellular Ca waves evokes arrhythmogenic oscillatory depolarization via the Na-Ca exchanger: simultaneous confocal recording of membrane potential and intracellular Ca in the heart. *Circ Res*. 2008; 103:509–518.

Gao, L., L. A. Blair, and J. Marshall. CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: reversible inhibition of L-type calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006; 345:1606–1610.

Gheorghide M, Adams KF, Jr., Colucci WS. Digoxin in the management of cardiovascular disorders. *Circulation*. 2004; 109:2959–64.

Gheorghide M, Patel K, Filippatos G, Anker SD, van Veldhuisen DJ, Cleland JG, Metra M, Aban IB, Greene SJ, Adams KF, McMurray JJ, Ahmed A. Effect of oral digoxin in high-risk heart failure patients: a pre-specified subgroup analysis of the DIG trial. *Eur J Heart Fail*. 2013; 15: 551–559.

Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ. Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 1998; 279: 870–873

Goldhaber JJ, Philipson KD. Cardiac sodium-calcium exchange and efficient excitation-contraction coupling: implications for heart disease. *Adv Exp Med Biol*. 2013; 961:355–64.

Gonano LA, Morell M, Burgos JJ, Dulce RA, De Giusti VC, Aiello EA, Hare JM, Vila Petroff M. Hypotonic swelling promotes nitric oxide release in cardiac ventricular myocytes: impact on swelling-induced negative inotropic effect. *Cardiovasc Res*. 2014; 104:456-66.

Gonano L. A., Sepúlveda M., Rico Y., Kaetzel M., Valverde C. A., Dedman J., et al. Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 2011; 4 947–957

Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1990; 258:C755–C786.

Gutierrez D. A., Fernandez-Tenorio M., Ogrodnik J., Niggli E. NO-dependent CaMKII activation during β -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc. Res.* 2013; 100 392–401.

Guo L, Qian JY, Abrams R, Tang HM, Weiser T, Sanders MJ, Kolaja KL. The electrophysiological effects of cardiac glycosides in human iPSC-derived cardiomyocytes and in guinea pig isolated hearts. *Cell Physiol Biochem.* 2011; 27:453–462.

Guo, T., Zhang, T., Mestril, R., and Bers, D. M. Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ. Res.* 2006; 99, 398–406.

Gupta RS, Chopra A, Stetsko DK. Cellular basis for the species differences in sensitivity to cardiac glycosides (digitalis). *J Cell Physiol.* 1986; 127:197–206.

Gyorke I, Gyorke S. Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca^{2+} involves luminal Ca^{2+} sensing sites. *Biophys J.* 1998; 75: 2801–2810.

Gyorke S, Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res.* 2008; 77:245–255.

Hanson, P. I., Meyer, T., Stryer, L., and Schulman, H. Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron* 1994;12, 943–956.

Hauptman PJ, Kelly RA. Digitalis. *Circulation* 1999; 99:1265–1270.

Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:6259–63.

Hasenfuss G, Mulieri LA, Allen PD, Just H, Alpert NR. Influence of isoproterenol and ouabain on excitation contraction coupling, cross-bridge function, and energetics in failing human myocardium. *Circulation.* 1996; 94:3155–3160.

Hervé JC, Derangeon M, Théveniau-Ruissy M, Miquerol L, Sarrouilhe D, Gros D. Connexins and junctional channels. Roles in the spreading of cardiac electrical excitation and heart development. *Pathol Biol (Paris)* 2008; 56(5):334–341.

Hidalgo CG, Chung CS, Saripalli Ch, Methawasini M, Hutchinson KR, Tsapralis G, Labeit S, Mattiazzi A, Granzier HL. The multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac spring elements. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 54: 90–97.

Ho HT, Stevens SC, Terentyeva R, Carnes CA, Terentyev D et al. Arrhythmogenic adverse effects of cardiac glycosides are mediated by redox modification of ryanodine receptors. *J Physiol* 2011; 589: 4697-4708

Ho H. T., Liu B., Snyder J. S., Lou Q., Brundage E. A., Velez-Cortes F., et al. Ryanodine receptor phosphorylation by oxidized CaMKII contributes to the cardiotoxic effects of cardiac glycosides. *Cardiovasc. Res.* 2014; 101 165–174.

Hook SS, Means AR. Ca²⁺/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev PharmacolToxicol* 2001; 41:471–505.

Homma N, Amran MS, Nagasawa Y, Hashimoto K. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger: involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchange system in cardiac triggered activity. *J Pharmacol Sci* 2006; 102: 17–21.

Hoyt RH, Cohen ML, Saffitz JE. Distribution and three-dimensional structure of intercellular junctions in canine myocardium. *Circ Res.* 1989; 64:563–574.

Hudmon, A., and Schulman, H. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 2002; 71, 473–510.

Huke S., Bers D. M. Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 2008; 376 80–85.

Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. (2009). Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009; 119:e391–479.

Inui M, Saito A, Fleischer S. Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J Biol Chem* 1987; 262:1740-1747.

Jett MF, Schworer CM, Bass M, Soderling TR. Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart. *Arch BiochemBiophys* 1987; 255:354–60.

Ji, Y., Li, B., Reed, T. D., Lorenz, J. N., Kaetzel, M. A., and Dedman, J. R. Targeted inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac longitudinal sarcoplasmic reticulum results in decreased phospholamban phosphorylation at threonine 17. *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 25063–25071.

Ji, J., Zhao, W., Li, B., Desantiago, J., Picht, E., Kaetzel, M., et al. Targeted inhibition of sarcoplasmic reticulum CaMKII activity results in alterations of Ca²⁺ homeostasis and cardiac contractility. *Am. J. Physiol.* 2006; 290, H599–H606.

Joiner ML, Koval OM, Li J, He BJ, Allamargot C, et al. CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature* 2012; 491: 269–273.

Kass RS, Lederer WJ, Tsien RW, Weingart R. Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibers. *J Physiol* 1978; 281: 187–208.

Kawamura A, Guo J, Itagaki Y, Bell C, Wang Y, Hauptert GT, Jr., Magil S, Gallagher RT, Berova N, Nakanishi K. On the structure of endogenous ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:6654–6659.

Keizer J, Smith GD, Ponce-Dawson S, Pearson JE. Saltatory propagation of Ca²⁺ waves by Ca²⁺ sparks. *Biophys J*. 1998; 75:595–600.

Kelly A, Elliott EB, Matsuda R, Kaneko N, Smith GL, Loughrey CM. The effect of K201 on isolated working rabbit heart mechanical function during pharmacologically induced Ca²⁺ overload. *Br J Pharmacol*. 2012; 165(4b):1068–1083.

Kelly RA, Smith TW. Pharmacological treatment of heart failure. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 1996:809–838.

Kennedy MB, Greengard P. Two calcium/calmodulin-dependent protein kinases, which are highly concentrated in brain, phosphorylate protein I at distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78:1293–7.

Kim DH, Akera T, Kennedy RH. Ischemia-induced enhancement of digitalis sensitivity in isolated guinea-pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 226: 335–342.

Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong M. F., Bohm M, et al. Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation* 2010; 121, 1606–1613.

Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, et al. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ Res*. 2006; 98, 235–244.

Köhler, F. E. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica Gera-Untermhaus: F.E. Köhler, 1887 [1883-1914] <http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/koehler/DIGITALIS.jpg>

Kometiani P, Liu L, Askari A. Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 2005; 67:929–36.

Koval, O. M., Guan, X., Wu, Y., Joiner, M. L., Gao, Z., Chen, B., et al. CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 107, 4996–5000.

Kulikov A, Eva A, Kirch U, Boldyrev A, Scheiner-Bobis G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768:1691–702.

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 U S A*. 2010; 107: 10274–10279.

Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., and Hamilton, S. L. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010; 2:a003996.

Lauten A, Abmann I, Knappe J: Acute electrophysiological effects of cardiac glycosides on sinus node function and ventricular repolarization under clinical conditions. *Cor Vasa* 1987; 29:436-43.

Lederer WJ, Tsien RW. Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibers. *J Physiol* 1976; 263: 73–100.

Lindemann JP, Watanabe AM. Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca²⁺-calmodulin-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 1985; 260, 4516-4525.

Liu N., Colombi B., Memmi M., Zissimopoulos S., Rizzi N., Negri S., et al. Arrhythmogenesis in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: insights from a RyR2 R4496C knock-in mouse model. *Circ. Res.* 2006; 99, 292–298.

Liu, N., Ruan, Y., Denegri, M., Bachetti, T., Li, Y., Colombi, B., et al. Calmodulin kinase II inhibition prevents arrhythmias in RyR2 (R4496C+/-) mice with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011; 50, 214–222.

Liu J.; Tian J.; Haas M.; Shapiro J. I.; Askari A.; Xie Z. Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 27838–27844.

Liu T, Brown DA, O'Rourke B Role of mitochondrial dysfunction in cardiac glycoside toxicity. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49: 728–736.

Lotan CS, Miller SK, Pohost GM, Elgavish GA. Amiloride in ouabain-induced acidification, inotropy and arrhythmia: ²³Na & ³¹P NMR in perfused hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1992; 24:243-257.

Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51: 288–298.

Lown B, Graboys TB, Podrid PJ, et al. Effect of a digitalis drug on ventricular premature beats. *N Engl J Med.* 1977; 296: 301–306.

Ma G, Brady WJ, Pollack M, Chan TC. Electrocardiographic manifestations: digitalis toxicity. *J Emerg Med.* 2001; 20:145-52.

MacLennan DH and Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 566–577.

Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:919–39.

Maier, L. S., and Bers, D. M.. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc. Res.* 2007; 73, 631–640.

Maier LS, Ziolo MT, Bossuyt J, Persechini A, Mestrlil R, Bers DM. Dynamic changes in free Ca-calmodulin levels in adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41:451–8.

Maier, L. S., Zhang, T., Chen, L., Desantiago, J., Brown, J. H., and Bers, D. M. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ. Res.* 2003; 92, 904–911.

Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 2000; 101, 365–376.

Mattiazzi A; Mundiña-Weilenmann C; Vittone L; Vila Petroff MG. Acoplamiento Excito-Contráctil en el Corazón Normal y Patológico. Fisiopatología cardiovascular. Bases racionales para la terapéutica. Corpus. Buenos Aires; 2006.

Mattiazzi A., Kranias E. G. CaMKII regulation of phospholamban and SR Ca²⁺ load. *Heart Rhythm* 2011; 8, 784–787.

Mattiazzi A, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase: a key component in the contractile recovery from acidosis. *Cardiovasc Res* 2007; 73:648–56.

Maxwell JT, Domeier TL, Blatter LA. Dantrolene prevents arrhythmogenic Ca²⁺ release in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012; 302:H953–H963.

McConkey DJ, Lin Y, Nutt LK, Ozel HZ, Newman RA. Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60:3807–12.

McDonough AA, Velotta JB, Schwinger RH, Philipson KD, Farley RA. The cardiac sodium pump: structure and function. *Basic Res Cardiol.* 2002; 97(Suppl 1):I19–I24.

McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, et al; ESC Committee for Practice Guidelines. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 2012; 14:803–869.

Meissner G. Regulation of ryanodine receptor ion channels through posttranslational modifications. *Curr.Top.Membr.* 2010; 66:91–113.

Mishra S., Gray C. B., Miyamoto S., Bers D. M., Brown J. H. Location matters: clarifying the concept of nuclear and cytosolic CaMKII subtypes. *Circ. Res.* 2011;109, 1354–1362.

Mundina-Weilenmann C, Vittone L, Ortale M, de Cingolani GC, Mattiazzi A. Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart. *J Biol Chem.* 1996; 271:33561–33567.

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. 271: p. 33561-7.

Nemec J, Kim JJ, Gabris B, Salama G. Calcium oscillations and T-wave lability precede ventricular arrhythmias in acquired long QT type 2. *Heart Rhythm* 2010; 7: 1686–1694.

Niggli E, Ullrich ND, Gutierrez D, Kyrychenko S, Poláková E et al. Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca²⁺ signaling and EC-coupling. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1833: 866-875.

Nishio S, Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Saito S, Fukui A, Kume O, Fukunaga N, Hara M, Nakagawa M, Saikawa T. Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52:1103-11.

O'Rourke B, Blatter LA. Mitochondrial Ca²⁺ uptake: tortoise or hare? *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46:767–74.

Packer M, Gheorghide M, Young J, Costantini P, Adams K, Cody R, Smith L, Van Voorhees L, Gourley L, Jolly M. Withdrawal of digoxin from patients with chronic heart failure treated with angiotensin-converting-enzyme inhibitors. RADIANCE Study. *N Engl J Med* 1993; 329:1–7.

Palomeque, J., Rueda, O. V., Sapia, L., Valverde, C. A., Salas, M., Petroff, M. V., et al.. Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca²⁺ dependence of Ca²⁺-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. *Circ. Res.* 2009; 105, 1204–1212.

Pellicena, P., and Schulman, H. CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front. Pharmacol.* 2014; 5:21.

Peters NS, Wit AL. Myocardial architecture and ventricular arrhythmogenesis. *Circulation.* 1998; 97:1746–1754.

Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293:C1073-C1081.

Pitt GS. Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 641–647.

Priori S. G., Chen S. R. Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis. *Circ. Res.* 2011; 108 871–883.

Pogwizd SM. Focal mechanisms underlying ventricular tachycardia during prolonged ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 1994; 90: 1441–1458.

Pogwizd SM, McKenzie JP, and Cain ME. Mechanisms underlying spontaneous, and induced ventricular arrhythmias in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1998; 98: 2404–2414.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1965; Vol. 118, Pg. 756,.

Prosser B. L., Ward C. W., Lederer W. J. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* 2011; 333, 1440–1445.

Rosen, M. R., Gelbland, H., Merker, C. & Hoffman, B. F. Mechanisms of digitalis toxicity. *Circulation.* 1973; 47, 681-689.

Sacherer M, Sedej S, Wakula P, Wallner M, Vos MA, Kockskamper J, Stiegler P, Sereinigg M, von Lewinski D, Antoons G, Pieske BM, 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.

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; 2(6):664-75.

Sagawa T, Sagawa K, Kelly JE, Tsushima RG & Wasserstrom JA. Activation of cardiac ryanodine receptors by cardiac glycosides. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282, H1118–H1126.

Said M, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A. The relative relevance of phosphorylation of Thr17 residue of phospholamban is different at different levels of β -adrenoceptor stimulation. *Pflügers Archiv European J. Physiol*. 2002; 444:801-809.

Said M, Becerra R, Palomeque J, Rinaldi G, Kaetzel MA, Diaz-Sylvester PL, Copello JA, Dedman JR, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A. Increased intracellular Ca^{2+} and SR Ca^{2+} load contribute to arrhythmias after acidosis in rat heart. Role Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 295: H1669–H1683.

Saner HE, Lange HW, Pierach CA, Aeppli DM: Relation between serum digoxin concentration and the electrocardiogram. *Clin Cardiol* 1988; 11:752-756.

Santana LF, Kranias EG, Lederer WJ. Calcium sparks and excitation contraction coupling in phospholamban-deficient mouse ventricular myocytes. *J Physiol*. 1997; 503:21–29.

Sapia L., Palomeque J., Mattiazzi A., Petroff M. V. Na^{+}/K^{+} -ATPase inhibition by ouabain induces CaMKII-dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2010; 49: 459–468.

Satoh H, Ginsburg KS, Qing K, Terada H, Hayashi H, Bers DM. KB-R7943 block of Ca^{++} influx via Na^{+}/Ca^{++} exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents Ca^{++} overload in rat ventricular myocytes. *Circulation*. 2000; 101:1441–1446.

Shattock MJ, Bers DM. Rat vs. rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol*. 1989; 256: C813–C822.

Schlotthauer K, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. *Circ Res*. 2000; 87:774–780.

Schulman, H. and P. Greengard, Ca^{2+} -dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978; 75: p. 5432-6.

Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Quantitative assessment of the SR Ca^{2+} leak-load relationship. *Circ Res*. 2002; 91:594–600.

Simmerman HKB, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR. Sequence analysis of PLB: identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem* 1986; 261:133–41.

Skou JC. The identification of the sodium pump. *Biosci Rep* 2004; 24: 436–451.

Stern MD. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J.* 1992; 63:497–517.

Stokke, M. K., Briston, S. J., Jolle, G. F., Manzoor, I., Louch, W. E., Oyehaug, L., et al. Ca(2+) wave probability is determined by the balance between SERCA2-dependent Ca(2+) reuptake and threshold SR Ca(2+) content. *Cardiovasc. Res* 2011; 90, 503–512.

Sossalla S., Maurer U., Schotola H., Hartmann N., Didie M., Zimmermann W. H., et al. Diastolic dysfunction and arrhythmias caused by overexpression of CaMKII δ (C) can be reversed by inhibition of late Na(+) current. *Basic Res. Cardiol.* 2011;106 263–272.

Tanskanen, A. J., Greenstein, J. L., O'Rourke, B., and Winslow, R. L. The role of stochastic and modal gating of cardiac L-type Ca²⁺ channels on early after-depolarizations. *Biophys. J.* 2005; 88, 85–95.

Terentyev D, Rees CM, Li W, Cooper LL, Jindal HK, Peng X, Lu Y, Terentyeva R, Odening KE, Daley JM, Bist K, Choi BR, Karma A, Koren G. Hyperphosphorylation of RyRs Underlies Triggered Activity in Transgenic Rabbit Model of LQT2 Syndrome. *Circ Res.* 2014 Sep 23.pii: CIRCRESAHA.114.305146. [Epub ahead of print].

The Digitalis Investigation Group Investigators. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. *N Engl J Med* 1997; 336:525–533.

Tsien RW, Kass RS, Weingart R. Calcium ions and membrane current changes induced by digitals in cardiac Purkinje fibers. *Ann N Y Acad Sci.* 1978; 307: 483–490.

van Oort, R.J., Mccauley, M.D., Dixit, S.S., Pereira, L., Yang, Y., Respress, J. L., et al. Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promote life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *Circulation* 2010; 122, 2669–2679.

Venetucci LA, Trafford AW, Diaz ME, O'Neill SC, Eisner DA. Reducing ryanodine receptor open probability as a means to abolish spontaneous Ca²⁺ release and increase Ca²⁺ transient amplitude in adult ventricular myocytes. *Circ Res.* 2006; 98: 1299–1305.

Venetucci LA, Trafford AW, Eisner DA. Increasing ryanodine receptor open probability alone does not produce arrhythmogenic calcium waves: threshold sarcoplasmic reticulum calcium content is required. *Circ Res.* 2007; 100:105–111.

Vila Petroff MG. Aislamiento de Miocitos; Introducción al Análisis Científico del Aparato Cardiovascular en Bioingeniería. Buenos Aires; 2004; p. 80 – 90.

Vila Petroff M, Aiello EA, Palomeque J, Salas MA, Mattiazzi A. Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium. *J Physiol* 2000; 529 (Pt 1) pp. 189–203.

Vila Petroff M, Kim SH, Pepe S, Dessy C, Marbán E, Balligand JL, Sollott SJ. Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca²⁺ release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol.* 2001; 3:867-873.

Vila-Petroff M, Mundiña-Weilenmann C, Lezcano N, Snabaitis AK, Huergo MA, Valverde CA, Avkiran M, Mattiazzi A. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to intracellular pH recovery from acidosis via Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger activation. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 49:106-12.

Vila Petroff M, Salas MA, Said M, Valverde CA, Sapia L, Portiansky E, Hajjar RJ, Kranias EG, Mundiña-Weilenmann C, Mattiazzi A. CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2007; 73:689-698.

Vila Petroff MG; Pérez NG. Calcio-pH-Sodio Intracelular; Introducción al Análisis Científico del Aparato Cardiovascular en Bioingeniería. Buenos Aires; 2004; p. 100 – 120.

Vittone L, Mundiña C, Chiappe de Cingolani G, Mattiazzi A. cAMP and calcium dependent mechanisms of phospholamban phosphorylation in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1990; 258:H318–25.

Vittone L, Mundiña C, Chiappe de Cingolani G, Mattiazzi A. Role of Ca²⁺-calmodulin dependent phospholamban phosphorylation on the relaxant effect of β -adrenergic agonists. *Mol. Cell. Biochem.* 1993; 124: 33-42.

Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RWF, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harrison DWG, Higgins AJ, Julian DG, Lab MJ, Manning AS, Northover BJ, Parratt JR, Riemersma RA, Riva E, Russell DC, Sheridan DJ, Winslow E, Woodward B. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988; 22:447–55.

Watabe M, Masuda Y, Nakajo S, Yoshida T, Kuroiwa Y, Nakaya K. The cooperative interaction of two different signaling pathways in response to bufalin induces apoptosis in human leukemia U937 cells. *J Biol Chem* 1996; 271:14067–72.

Weiss J. N., Garfinkel A., Karagueuzian H. S., Chen P.-S., Qu Z. Early afterdepolarizations and cardiac arrhythmias. *Heart Rhythm* 2010; 7 1891–1899.

Weiss J.N., M. Nivala, A. Garfinkel, Z. Qu. Alternans and arrhythmias: from cell to heart. *Circ Res* 2011; 108, 98–112.

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Deng SX, Vest JA, Cervantes D, Coromilas J, Landry DW, Marks AR. Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science* 2004; 304: 292–296.

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 2004; 94:e61–70.

Weber CR, Piacentino IIV, Ginsburg KS, Houser SR, and Bers DM. Na/Ca exchange current, and submembrane [Ca] during the cardiac action potential. *Circ Res* 2002; 90: 182–189.

Wilkins BJ, Molckentin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322:1178–91.

Wilkins MR, Kendall MJ, Wade OL. William Withering and digitalis, 1785 to 1985. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 290:7-8.

Wu, Y., MacMillan, L. B., McNeill, R. B., Colbran, R. J., and Anderson, M. E. CaM kinase augments cardiac L-type Ca^{2+} current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias. *Am. J. Physiol.* 1999; 276, H2168-H2178.

Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, et al. Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* 2002; 106:1288-93.

Wu Y, Roden DM, Anderson ME. Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res.* 1999; 84:906-912.

Xiao, B., Zhong, G., Obayashi, M., Yang, D., Chen, K., Walsh, M. P., et al. Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem. J.* 2006; 396, 7-16.

Xiao RP, Cheng H, Lederer WJ, Suzuki T, Lakatta EG. Dual regulation of Ca/calmodulin kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:9659-63.

Xie Z. Ouabain interaction with cardiac Na/K-ATPase reveals that the enzyme can act as a pump and as a signal transducer. *Cell. Mol. Biol.* 2001; 47, 383-390.

Xie Y, Sato D, Garfinkel A, Qu Z, Weiss JN. So little source, so much sink: requirements for afterdepolarizations to propagate in tissue. *Biophys J.* 2010; 99:1408-1415.

Xie, L.H., and Weiss, J. N. Arrhythmogenic consequences of intracellular calcium waves. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 297, H997-H1002.

Yang Z, Pascarel C, Steele DS, Komukai K, Brette F & Orchard CH. Na^{+} - Ca^{2+} exchange activity is localized in the t-tubules of rat ventricular myocytes. *Circ Res* 2002; 91, 315-322.

Yang, D., Zhu, W. Z., Xiao, B., Brochet, D. X., Chen, S. R., Lakatta, E. G., et al. Ca^{2+} /calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of ryanodine receptors suppresses Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2007; 100, 399-407.

Yin J, Wang Y, Li Q, Shang Z, Su S, Cheng Y, Xu Y. Effects of nanomolar concentration dihydroouabain on calcium current and intracellular calcium in guinea pig ventricular myocytes. *Life Sci* 2004; 76: 613-628.

Yuan W, Bers DM. Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin dependent protein kinase. *Am J Physiol* 1994; 267:H982-93.

Uretsky BF, Young JB, Shahidi FE, Yellen LG, Harrison MC, Jolly MK. Randomized study assessing the effect of digoxin withdrawal in patients with mild to moderate chronic congestive heart failure: results of the PROVED trial. *PROVED Investigative Group. J Am Coll Cardiol* 1993; 22:955-962.

Zipes DP. Mechanisms of clinical arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; 14:902.

Zhang T, Brown JH. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 2004; 63:476–86.

Zhang, T., Maier, L. S., Dalton, N. D., Miyamoto, S., Ross, J. Jr., Bers, D. M., et al. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ. Res.* 2003; 92, 912–919.

Zhang, T., Johnson, E. N., Gu, Y., Morissette, M. R., Sah, V. P., Gigena, M. S., et al.. The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 1261–1267.

Zhou, Q., Xiao, J., Jiang, D., Wang, R., Vembaiyan, K., Wang, A., et al. Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca²⁺ release. *Nat. Med.* 2011; 17, 1003–1009.