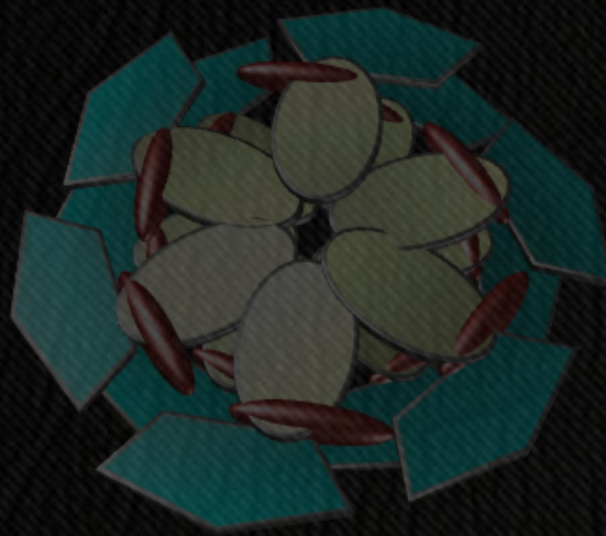




UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
Facultad de Ciencias Médicas



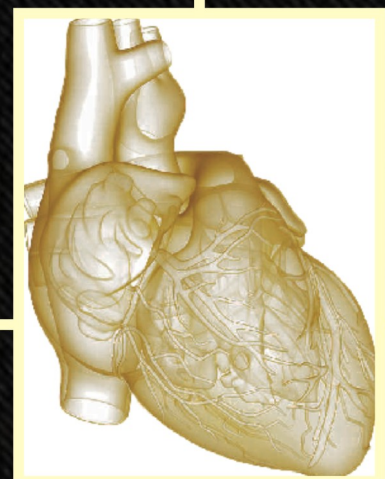
# ROL DE LA CaMKII EN LA INJURIA IRREVERSIBLE POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN



TRABAJO DE TESIS DOCTORAL  
Mariano Nahuel Di Carlo

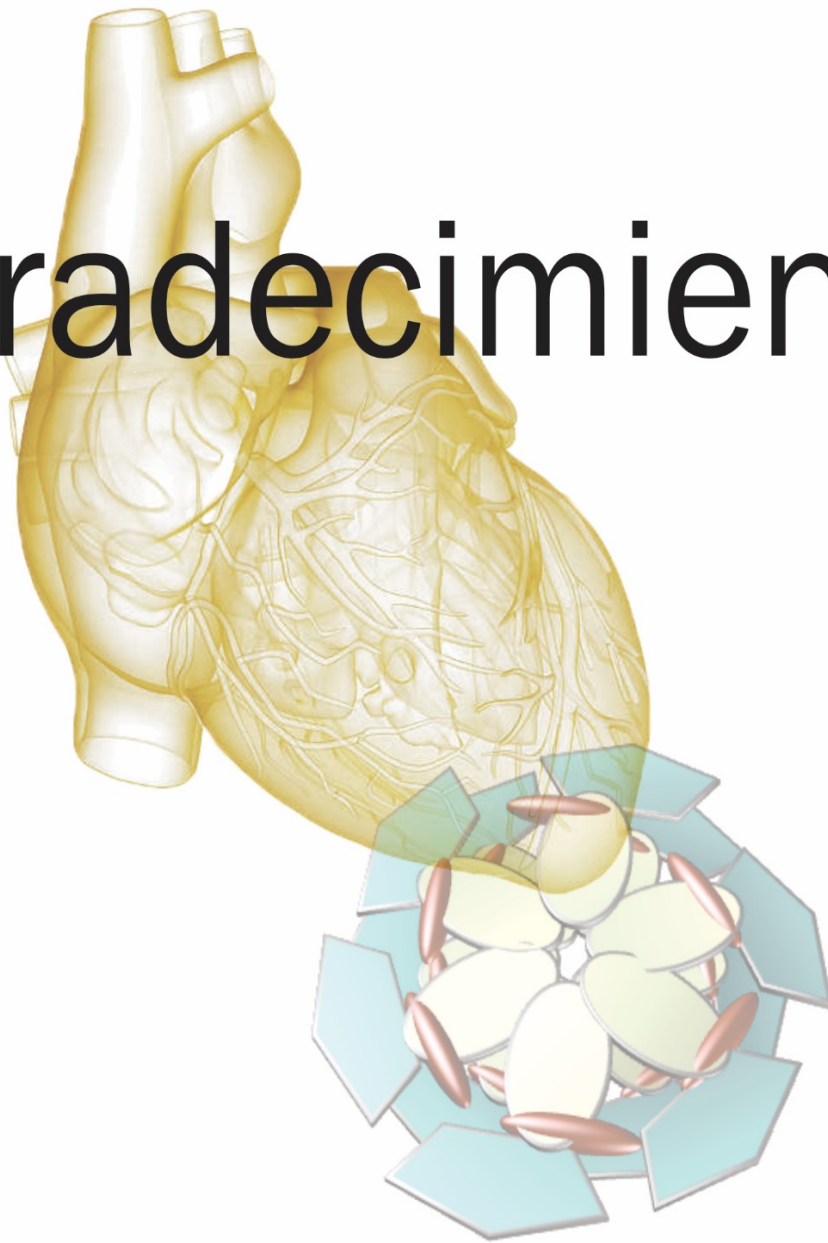
Directora: Prof. Dra. Margarita Ana Salas  
Co-directora: Prof. Dra. María Matilde Said

La Plata, 2016



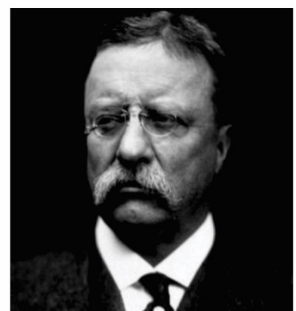
Lugar de realización:  
CENTRO DE INVESTIGACIONES  
CARDIOVASCULARES

# Agradecimientos



*«Es sólo a través del trabajo y del esfuerzo doloroso, por la energía sombría y el valor resuelto, que pasamos a cosas mejores».*

**Theodore Roosevelt (1858-1919)**



Todos sabemos que cualquier logro requiere, por lo menos, un mínimo esfuerzo. Largo ha sido el camino para alcanzar este momento, el de haber finalizado la tesis que ahora tiene en sus manos. Sin embargo, paso a paso en este camino, la vida me ha presentado a muchas personas maravillosas que me han permitido convertir todos los retos y obstáculos en valiosas enseñanzas.

A la Dra. Margarita Ana Salas, mi directora, quiero agradecerle por haberme aceptado como su becario y ser mi guía para desarrollar este trabajo de tesis y el compromiso en mi formación profesional y humana, contando con su apoyo incondicional en todo momento.

A la Dra. María Matilde Said, mi co-directora de tesis doctoral, le agradezco su inagotable paciencia y su empuje y dedicación que me han permitido eliminar todos los obstáculos que se me fueron presentando, por transmitirme todos sus conocimientos y apoyarme siempre y en todo momento, siendo un pilar fundamental en mi aprendizaje. Le doy gracias por la oportunidad de haberme ganado su confianza y por su opinión siempre sincera.

A la Dra. Alicia Mattiazzi le agradezco infinitamente por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi trabajo de tesis doctoral abriéndome las puertas del Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CIC) y depositando en mí toda su confianza, estando siempre abierta a todas mis inquietudes y preguntas siempre con buena predisposición todas y cada una de las veces que tuve que acudir a ella.

Al Dr. Carlos Valverde, por sus importantes aportes y activa participación, que sin duda ha enriquecido este trabajo de tesis.

A Mónica Rando por ser mi primera maestra en el laboratorio y transmitirme todo su conocimiento con humanidad y paciencia, dándole un sólido cimiento a mis primeros pasos, que formaron la base fundamental de lo que hoy es este trabajo de tesis doctoral.

A Omar Castillo, ya que con su experiencia, esfuerzo y compromiso con su profesión realizó aportes significativos que permitieron cumplir con parte de los objetivos propuestos en el presente trabajo de tesis.

A todos los becarios, personal de apoyo e investigadores del Centro de Investigaciones Cardiovasculares, a quienes no mencionaré por el simple hecho de correr el riesgo de olvidarme de alguno de ellos, porque de todos he recibido afecto, amistad, apoyo, consejo, guía, experiencia, motivación, esperanza y más...

**A mis Padres...**



## ÍNDICE GENERAL

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	6
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>CONSIDERACIONES SOBRE LA FISIOLÓGÍA CARDÍACA.....</b>	<b>11</b>
LA ESTRUCTURA DEL CORAZÓN.....	11
EL APARATO CONTRÁCTIL DEL MIOCARDIO .....	13
ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN.....	15
LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y LOS TÚBULOS TRANSVERSOS .....	17
CANALES DE Ca <sup>2+</sup> OPERADOS POR VOLTAJE.....	19
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (RE) Y RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO (RS) .....	21
Ca <sup>2+</sup> -ATPasa DEL RS (SERCA2a) .....	23
FOSFOLAMBAN (PLN) .....	25
RECEPTOR DE RIANODINA (RyR).....	28
CALMODULINA .....	35
PROPIEDADES Y FUNCIONES DE LA CaMKII.....	36
<b>EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
A) SOBRECARGA DE Ca <sup>2+</sup> .....	42
B) AUMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ROS/RNS .....	45
c) MUERTE CELULAR.....	46
c.i) NECROSIS .....	46
c.ii) APOPTOSIS.....	48
c.iii) AUTOFÁGICA.....	51
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	53
OBJETIVOS.....	53
General .....	53
Particulares.....	53
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
ANIMALES.....	55
PERFUSIÓN DE CORAZONES DE RATÓN. TÉCNICA DE LANGENDORFF. ....	56
DETERMINACIÓN DEL ÁREA DE INFARTO .....	58
DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LÁCTICO DESHIDROGENASA (LDH).....	58
DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS.....	59
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS .....	60
AISLAMIENTO DE MIOCITOS.....	63

MEDICIÓN DE LA CORRIENTE DE $Ca^{2+}$ ( $I_{Ca^{2+}}$ ) EN MIOCITOS AISLADOS .....	64
--	----

## RESULTADOS.....66

DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFORILACIONES DEL RS DEPENDIENTES DE CaMKII EN LA INJURIA POR I/R.....	67
DISECCIÓN DEL ROL DESEMPEÑADO POR CADA UNA DE LAS FOSFORILACIONES DEPENDIENTES DE CaMKII A NIVEL DEL RS .....	73

## DISCUSIÓN.....84

BREVE RESUMEN DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS.....	86
ELECCIÓN DEL PROTOCOLO DE I/R EMPLEADO EN LOS EXPERIMENTOS .....	86
LA ACTIVACIÓN DE CaMKII Y SUS CONSECUENCIAS EN EL CONTEXTO DE LA INJURIA POR I/R.....	87
PARTICIPACIÓN DEL RS EN EL EFECTO DELETÉREO DE LA ACTIVACIÓN DE CaMKII .....	89
EXPRESIÓN Y FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL RS BLANCO DE CaMKII .....	91
LA FOSFORILACIÓN DEL SITIO T17 DE PLN POR CaMKII BRINDA CARDIOPROTECCIÓN FRENTE A LA INJURIA POR I/R.....	91
LA FOSFORILACIÓN DEL SITIO S2814 DEL RYR2 POR CaMKII ES LA RESPONSABLE DE LOS EFECTOS PERJUDICIALES DURANTE LA I/R .....	94
EL PAPEL DE LA APOPTOSIS EN LA INJURIA POR I/R .....	95
CONCLUSIÓN FINAL.....	97
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	97

## BIBLIOGRAFÍA.....97

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

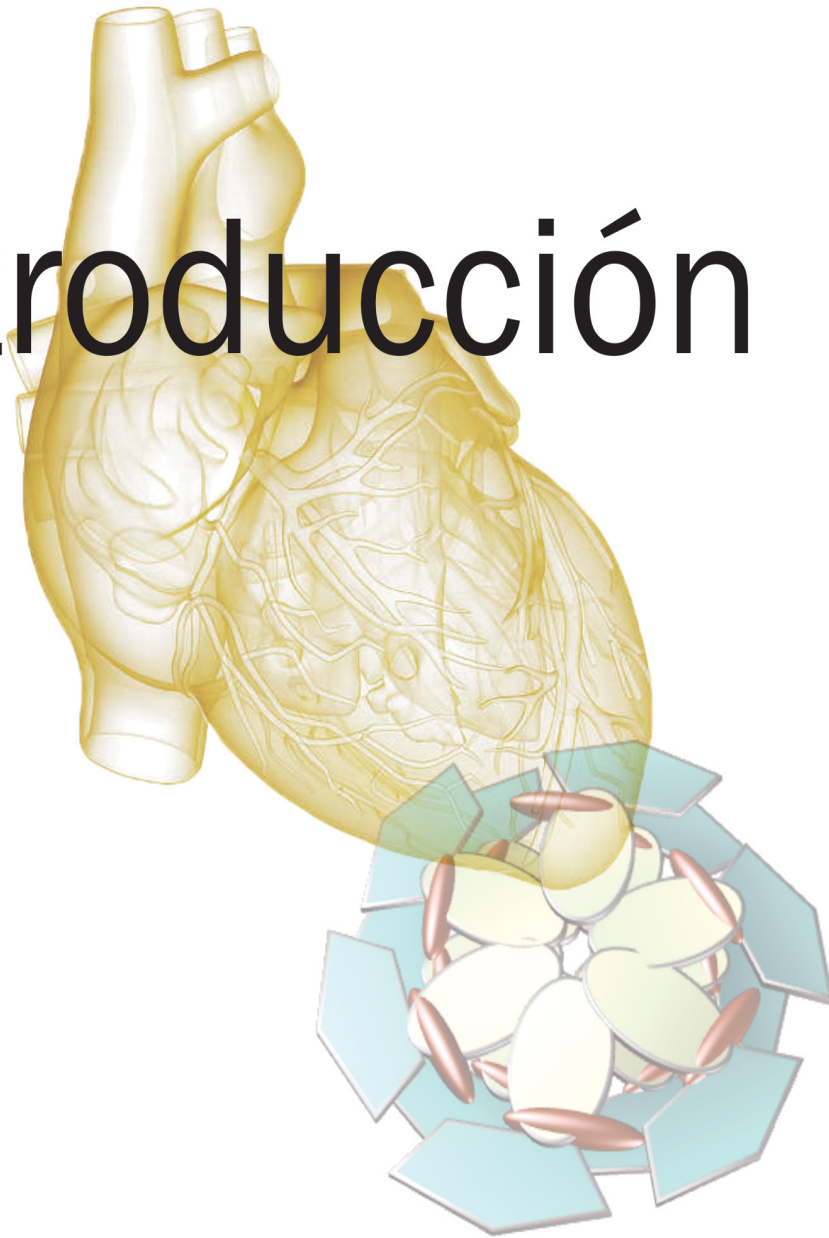
<b>AAR</b>	Área en riesgo (en inglés, área at risk)
<b>AEC</b>	Acoplamiento excitación-contracción o excito-contráctil
<b>ANT</b>	Translocasa de nucleótidos de adenina
<b>BDM</b>	2,3-butanediona monoxima
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CaMKII</b>	Calcio Calmodulina Quinasa tipo II
<b>CaMKs</b>	Quinasas dependientes de $Ca^{2+}$ y CaM
<b>CAT</b>	Constricción de la aorta transversa
<b>CICR</b>	Liberación de $Ca^{2+}$ inducida por $Ca^{2+}$ (en inglés: Calcium induced Calcium release)
<b>C<sub>ter</sub></b>	Extremo COOH terminal de la proteína
<b>CTL</b>	Control o ratón wild type (WT)
<b>CypD</b>	Ciclofilina D
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>HRC</b>	Proteína unidora de $Ca^{2+}$ rica en histidina (Histidine Rich Calcium binding protein)
<b>hs</b>	Horas
<b>I/R</b>	Isquemia y Reperfusión
<b>IAM</b>	Infarto agudo de miocardio
<b>Iso</b>	Isoproterenol
<b>jRS</b>	Retículo sarcoplasmático de la unión (en inglés, junctional RS)
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LTCC</b>	Canales de $Ca^{2+}$ lentos (del inglés L-type Calcium Channels)
<b>min</b>	Minuto/minutos

<b>mm</b>	Milímetro/milímetros
<b>MME</b>	Membrana mitocondrial externa
<b>MMI</b>	Membrana mitocondrial interna
<b>mPTP</b>	Poros de permeabilidad transitoria mitocondrial
<b>mseg</b>	Milisegundos
<b>mV</b>	Milivoltios
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida
<b>NCX</b>	Intercambiador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
<b>NHE</b>	Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
<b>NRMI</b>	Registro Nacional de Infarto del Miocardio de EE.UU.
<b>N<sub>ter</sub></b>	Extremo NH <sub>3</sub> terminal de la proteína
<b>O<sub>2</sub>•-</b>	Radical superóxido
<b>ON</b>	Óxido nítrico
<b>PA</b>	Potencial de acción
<b>PDFVI</b>	Presión diastólica final del ventrículo izquierdo
<b>PDVI</b>	Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo
<b>PKA</b>	Proteína Quinasa A
<b>PKC</b>	Proteína Quinasa C
<b>PLN</b>	Fosfolamban
<b>PLNDM</b>	Cepa doble mutante de PLN (ambos sitios de fosforilación mutados a alanina)
<b>PNA</b>	Péptido natriurético auricular
<b>P<sub>o</sub></b>	Probabilidad de apertura
<b>Pre-Isq.</b>	Preisquemia/Grupo de corazones preisquémicos.
<b>R</b>	Reperusión
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico



<b>RIP-3</b>	Receptor-interacting protein-3
<b>RNS</b>	Especies reactivas del N <sub>2</sub>
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno (en inglés, reactive oxygen species )
<b>RS</b>	Retículo sarcoplasmático
<b>RyR2</b>	Receptor de Rianodina tipo 2
<b>S16</b>	Sitio de fosforilación de fosfolamban en el aminoácido serina en posición 16
<b>S2814A</b>	Cepa mutante del RyR2 (el sitio Ser2814 fue reemplazado por alanina)
<b>S2814D</b>	Cepa mutante del RyR2 (el sitio Ser2814 fue reemplazado por un residuo de aspartato)
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio
<b>SERCA2a</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPasa del RS (en inglés, Sarco-Endoplasmic-Reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase tipo 2)
<b>SOICR</b>	En inglés, Store Overload-Induced Calcium Release
<b>SR-AIP</b>	Cepa mutante que expresa un inhibidor de la CaMKII dirigido específicamente al retículo sarcoplasmático.
<b>STAL</b>	Sistema Tubular Axial-Longitudinal
<b>T17</b>	Sitio de fosforilación de fosfolamban en el aminoácido treonina en posición 17
<b>Tm</b>	Tropomiosina
<b>Tn</b>	Troponina
<b>TT</b>	Túbulos T
<b>TUNEL</b>	En inglés, Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
<b>V</b>	Voltios
<b>VDAC</b>	Canal de aniones dependiente de voltaje
<b>VDCCs</b>	Canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje (en inglés, voltaje dependent calcium channels)
<b>VI</b>	Ventrículo izquierdo

# Introducción



*«El mejor científico está abierto a la experiencia, y ésta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible».*

**Ray Bradbury (1920-2012)**



La palabra isquemia hace referencia a un riego sanguíneo insuficiente de los tejidos provocado por obstrucción del flujo arterial. La aterosclerosis coronaria es el substrato patológico subyacente en la mayoría de los casos de isquemia miocárdica [Gimbrone MA, 2013]. La reducción o el cese del suministro de sangre al corazón, conduce a la depleción de oxígeno y sustratos metabólicos alterando la homeostasis celular. Si el tiempo de isquemia se prolonga y en ausencia de circulación colateral significativa, la totalidad del área afectada se convierte en tejido necrótico dando lugar a un infarto agudo de miocardio establecido (IAM) La restauración del flujo o reperfusión terapéutica del lecho afectado, si bien necesaria, da origen a una serie de procesos capaces de sumar nuevas alteraciones celulares. La entidad fisiopatológica resultante de ambos eventos (isquemia y reperfusión) se denomina *injuria irreversible por isquemia y reperfusión (I/R)*.

Para el conjunto de la población mundial la enfermedad cardiovascular representa la principal causa de muerte y esta situación persistirá mientras no haya un cambio en la incidencia de los factores de riesgo (obesidad, hipertensión, sedentarismo, diabetes, etc.) [Mathers CD, 2006]. A pesar de los adelantos en el tratamiento de la cardiopatía isquémica al haberse mejorado los procedimientos de reperfusión, avanzado la tecnología de los stent [Palmaz JC, 1997] y generado nuevos y más eficientes fármacos, un tercio de las muertes en el mundo aún es producida por esta patología [Mendis S, 2011]. Al igual que sucede con otras enfermedades, el IAM tiene un alto impacto social no solo por la elevada mortalidad, sino también por la pérdida de calidad de vida, la discapacidad, y la disminución de la actividad productiva de los pacientes, lo cual implica elevados costos económicos [Blanco P, 2008].

En EE.UU. se estima que aproximadamente cada 42 segundos se produce un IAM y el 34% de las personas que presentan un evento coronario terminarán falleciendo a causa del mismo [Mozaffarian D, 2016].

En Argentina, unas 40.000 internaciones anuales son debidas a IAM [Piombo AC, 2011] y una de cada tres muertes es producto de esta patología [Allín

JG, 2010]. La relevancia del problema ha conducido a que las autoridades sanitarias nacionales promulguen la Ley 25.501 de Control y Prevención de las Enfermedades Cardiovasculares (2009).

Actualmente, el objetivo terapéutico en el abordaje del IAM, es lograr una optimización de las estrategias de restablecimiento del flujo sanguíneo permitiendo minimizar los efectos adversos que esta maniobra desencadena.

Para actuar sobre el daño que produce la reperfusión, es fundamental conocer los procesos fisiopatológicos que tienen lugar durante la misma.

El presente trabajo de tesis tuvo como finalidad profundizar en los mecanismos y las consecuencias funcionales de la injuria por I/R miocárdica centrándonos en el rol que cumple la isoforma II de la proteína quinasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y calmodulina (CaMKII).

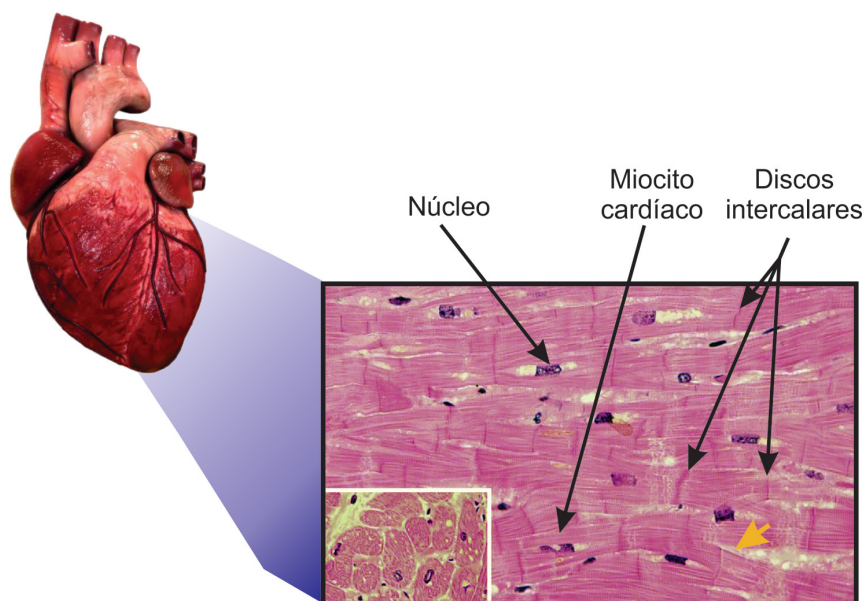
## CONSIDERACIONES SOBRE LA FISIOLÓGÍA CARDÍACA

### LA ESTRUCTURA DEL CORAZÓN

El corazón es una bomba muscular de cuatro cámaras, cuya función primordial consiste en llevar a cabo ciclos de contracción y relajación en forma regular y coordinada, favoreciendo el movimiento de la sangre en el interior del sistema circulatorio. Dicha función depende en forma crítica de los miocitos cardíacos (**Figura 1**). Estas células, predominantemente mononucleadas, de un tamaño que oscila entre 15 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro y 80 a 120  $\mu\text{m}$  de longitud, conforman el parénquima del corazón [Scholdz D, 1994]. Ellas funcionan como una estructura sincicial altamente coordinada, producto de la existencia de los discos intercalares que las relacionan. En estos residen las proteínas llamadas conexinas las cuales forman canales de baja resistencia (conexones), que constituyen la base funcional del acoplamiento eléctrico entre los miocitos [Kleber AG, 2014].



Los miocitos representan aproximadamente el 30% de la celularidad cardíaca [Nag AC, 1980], pero dado su gran tamaño, constituyen cerca del 90% de la masa miocárdica total. El 10% restante está formado por tejido



**Figura 1. Estructura histológica del miocardio normal teñido con Hematoxilina-Eosina.** En un corte longitudinal se observan los miocitos cardíacos como células musculares estriadas con ramificaciones (flecha amarilla). Los cardiomiocitos están relacionados entre sí a través de los discos intercalares. En el recuadro inferior se muestra un corte transversal del miocardio con el núcleo del miocito ubicado centralmente.

células no miocíticas y por la matriz extracelular (MEC). Este tejido constituye el andamiaje que sustenta a los miocitos y es un elemento con influencia directa en la función diastólica y sistólica [Weber KT, 1999].

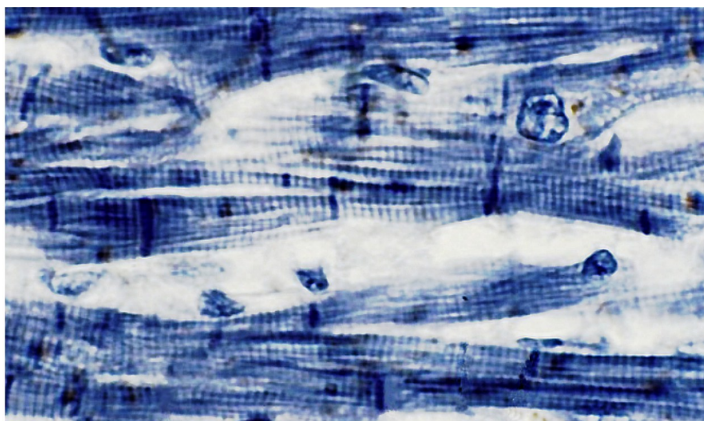
Las células no miocíticas son fibroblastos (95%), [Eghbali M, 1991], macrófagos residentes, células plasmáticas, neuronas y células relacionadas con la vasculatura cardíaca (células endoteliales, células musculares lisas y pericitos) [Jugdutt BI, 2003].

La matriz extracelular está constituida por colágeno fibrilar como principal proteína estructural, y por otros componentes que incluyen glucosaminoglucanos y proteoglucanos, integrinas, fibronectina y laminina [Jugdutt BI, 2003]. El colágeno tipo I es el más abundante en el corazón, encontrándose también colágeno tipo III en una relación aproximada de 1,6 a 1 [Bonow RO, 2013].

Se utiliza la denominación de fibra muscular cardíaca para hacer referencia a la estructura constituida por un grupo de cardiomiocitos que se mantienen unidos por la acción del tejido conjuntivo circundante.

## EL APARATO CONTRÁCTIL DEL MIOCARDIO

El músculo cardíaco al igual que el esquelético, al ser observado en el microscopio óptico, presenta un aspecto estriado resultado de la presencia de estructuras repetidas en serie denominadas sarcómeros (**Figura 2 y Figura 3 A**). El sarcómero está



**Figura 2.** Corte de miocardio teñido con Hematoxilina férrica donde se resalta la estructura estriada.

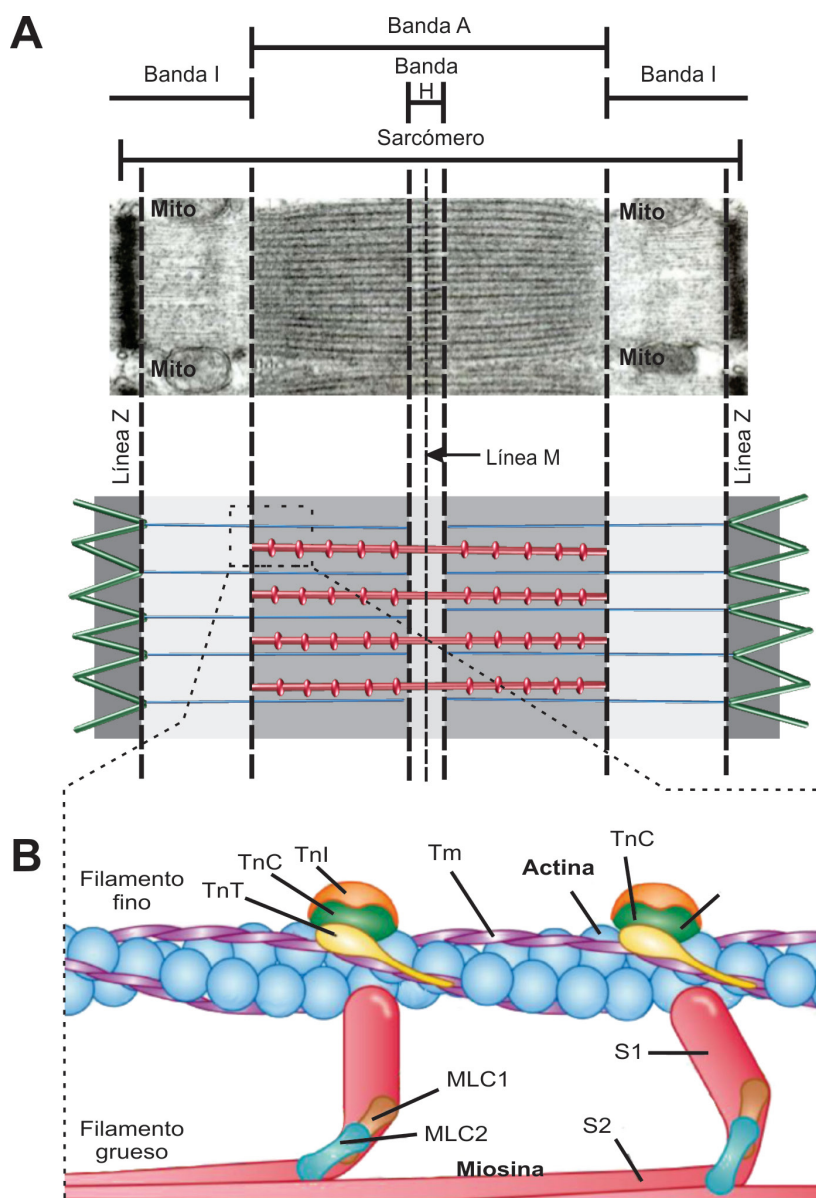
constituído a su vez por miofilamentos, delgados y gruesos, componentes básicos del aparato contráctil cuyo deslizamiento genera la contracción muscular [Moss RL, 2004]. La disposición de los miofilamentos, determina la formación de bandas claras (o bandas I, de Isotrópicas) formadas únicamente por filamentos finos y bandas oscuras (también llamadas A, de Anisotrópicas) donde se superponen filamentos finos y gruesos (**Figura 3 A**). El sarcómero comprende dos zonas I y una zona A y está delimitado por las líneas Z, lugar de unión de los filamentos delgados adyacentes. Los filamentos delgados están compuestos principalmente por actina, acompañada por un complejo proteico regulador: la troponina (Tn) y la tropomiosina (Tm). La Tn se compone a su vez de tres subunidades: la TnC que se une al  $\text{Ca}^{2+}$ , la TnI que inhibe la actividad ATPasa del complejo actina-miosina, y la TnT que interactúa con Tm (**Figura 3 B**) [Takeda S, 2003].

El filamento grueso está formado principalmente por miosina, una proteína de gran tamaño que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos pares de cadenas ligeras: la cadena ligera esencial (MLC1) y la cadena ligera reguladora (MLC2) [Trahair T, 1993; Moss RL, 2006]. Cada cadena pesada de miosina consiste en una región globular o cabeza (S1) y una cola larga  $\alpha$ -helicoidal (S2). Las cabezas globulares se unen a la actina, formando puentes cruzados entre los dos tipos de filamentos (**Figura 3 B**) [Moss RL, 2004].

La interacción entre filamentos finos y gruesos para producir la contracción, es precedida por un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (ver luego).

Este ión se une entonces a la TnC, dando lugar a cambios conformacionales en el complejo Tn-Tm que liberan el bloqueo sobre la actina y permiten la formación de enlaces cruzados actina-miosina, la hidrólisis de ATP y la producción de fuerza [Jin W, 2008]. Durante la relajación o diástole, el  $\text{Ca}^{2+}$  se disocia de la

TnC y es secuestrado por el retículo sarcoplasmático (RS). El complejo Tn-Tm entonces adopta una conformación que vuelve a bloquear la interacción actina-miosina [Bers DM, 2002].



**Figura 3. Estructura del sarcómero.** (A) Microfotografía electrónica mostrando las diferentes áreas. La banda H está formada exclusivamente por miosina. La línea central denominada línea M (por la proteína miomesina) permitiría la cohesión de los filamentos gruesos. Mito: mitocondria. (B) Diagrama que muestra la organización estructural de los filamentos finos, gruesos y sus proteínas reguladoras. TnT, troponina T; TnC, troponina C; TnI, troponina I; Tm, tropomiosina; S1, porción globular de la miosina; S2, cola helicoidal de la miosina; MLC1, cadena liviana esencial; MLC2, cadena ligera reguladora.

## ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN

La concepción de que la dinámica muscular estaba impulsada por actividad eléctrica tiene sus orígenes en las observaciones de Luigi Galvani quien demostró, hace unos 200 años, que la estimulación eléctrica del músculo esquelético del miembro inferior de sapo conducía a su contracción [Galvani LA, 1791].

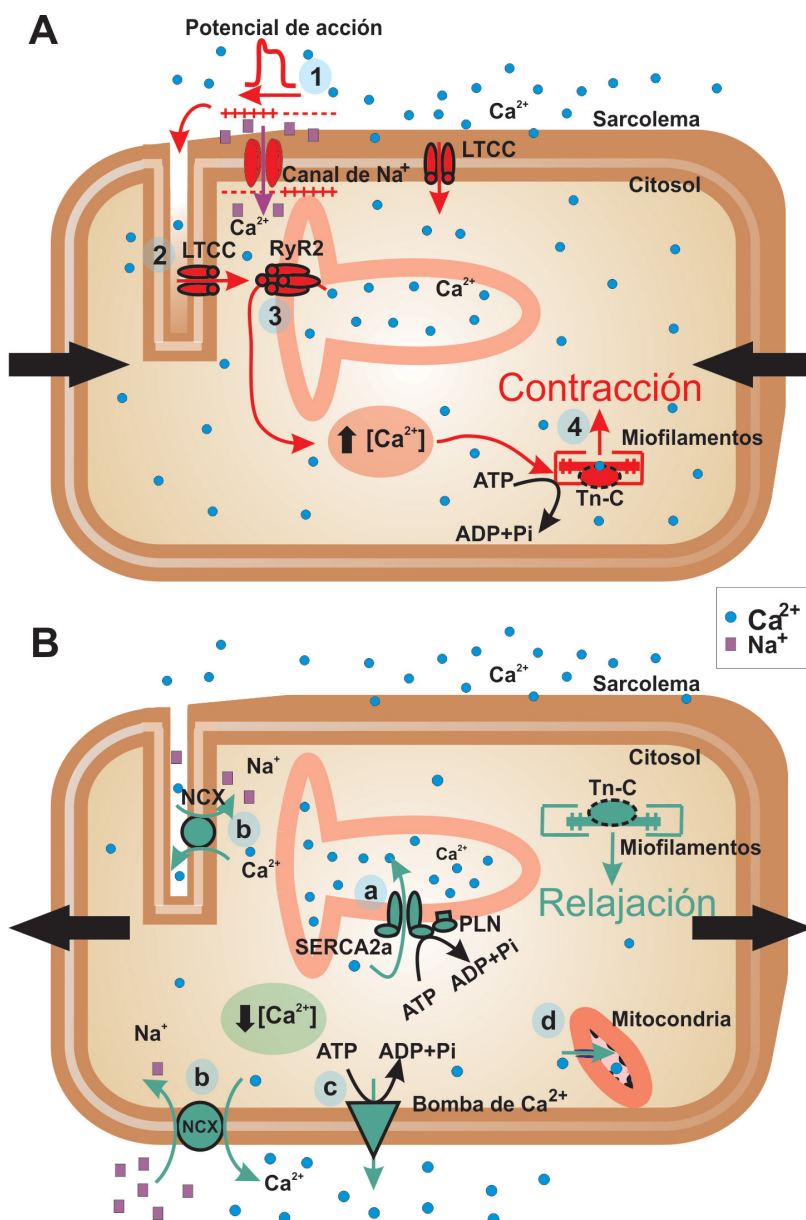
Recién casi 80 años más tarde, Bernstein registra el primer potencial de acción (PA) en el nervio [Bernstein J, 1868] determinando, con posterioridad, que el PA precede al inicio de la contracción en el músculo esquelético [Bernstein J, 1871]. Estas observaciones son las que dieron lugar al paradigma que sustenta el ciclo de funcionamiento muscular y que hoy conocemos como el acoplamiento excitación-contracción o excito-contráctil (AEC). Cerca de una década más tarde, tendría lugar otro hito fundamental entre los descubrimientos científicos que nos llevarían a comprender la naturaleza del funcionamiento cardíaco, surgido del hallazgo accidental realizado por Sydney Ringer [Ringer S, 1883]. Este fisiólogo cardiovascular se encontraba estudiando los efectos de distintas soluciones salinas conteniendo ClNa, K<sup>+</sup> y un buffer bicarbonato, sobre la contractilidad miocárdica. En este medio el corazón aislado dejaba de latir en poco tiempo. Afortunadamente un día, ante la falta de agua destilada, sus soluciones experimentales fueron preparadas con agua procedente de la canilla lo cual se tradujo en la contracción vigorosa del corazón por varias horas. Ringer consideró como un factor importante y causal la proporción substancial de Ca<sup>2+</sup> presente en esa agua concluyendo lo siguiente: *“el óxido de calcio o calcio bicarbonato, o cloruro de calcio, añadido a la solución salina, puede prevenir el debilitamiento y la detención del ventrículo que se produce con solución salina sola”*. Como podemos observar en la descripción de Ringer, el Ca<sup>2+</sup> es el elemento clave para el AEC.



La denominación de AEC se utiliza para describir al conjunto de fenómenos que se inician con la despolarización de la membrana plasmática y se continúan con la contracción y posterior relajación cardíaca. El potencial de acción originado en el nódulo sinusal se propaga por todo el corazón determinando finalmente la contracción del miocardio a una frecuencia aproximada de 70 latidos por minuto.

La despolarización del sarcolema es producida por la apertura de los canales rápidos de  $\text{Na}^+$  y el consecuente ingreso de éstos iones, llevando en un miocito

ventricular, el potencial de membrana desde -80 mV (potencial de reposo) hasta aproximadamente +35 mV. Este fenómeno induce una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula por los llamados canales de  $\text{Ca}^{2+}$  lentos (del inglés L-type Calcium Channels, LTCC) cuya apertura depende del voltaje de la membrana (-20mV). Esta etapa es clave en la contracción cardíaca, ya que determina el acople entre el estímulo eléctrico y la



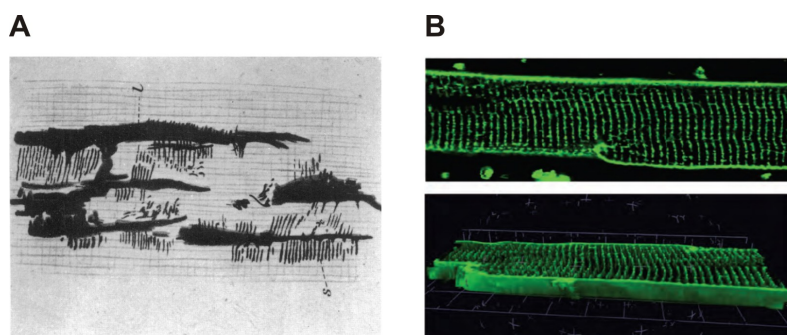
**Figura 4. Esquema que representa los principales eventos que se producen durante el AEC.** (A) Procesos que intervienen en la contracción (en rojo): 1) Ingreso de  $\text{Na}^+$  y despolarización, 2) Apertura de los LTCC e ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$ , 3) Apertura de los receptores de RyR2 y aumento del  $[\text{Ca}^{2+}]$ , 4) Unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a la TnC y contracción muscular. (B) Procesos que intervienen en la relajación (en verde): a) Recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  por SERCA2a hacia el RS, b) NCX en su modo directo, c)  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa de membrana extruyendo  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula y d) Ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria.

respuesta contráctil. Luego, el  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa interacciona con los canales liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplasmático (RS) llamados receptores de rianodina tipo 2, (RyR2), provocando la salida de más  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS hacia el citoplasma. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (en inglés: Calcium induced Calcium release -CICR), es la responsable de la contracción del cardiomiocito [Fabiato A, 1983].

A continuación, como fue ya descripto, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático a través de su interacción con la Troponina C (Tn-C) produce el acortamiento del sarcómero. El concepto de AEC también comprende los fenómenos relacionados con la relajación de los miocitos, lo cual implica la disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Este descenso en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se produce por: a) su recaptación hacia el RS a través de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  denominada SERCA2a (Sarco-Endoplasmic-Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase type 2a) regulada por la proteína fosfolamban (PLN), b) la extrusión hacia el exterior de la célula por intermedio del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) o c) por la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcolemal y d) la captación mitocondrial (**Figura 4**). Como consecuencia de los mecanismos descriptos la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  oscila normalmente entre 100nM y 1  $\mu\text{M}$  con cada latido.

## LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y LOS TÚBULOS TRANSVERSOS

Como cualquier otro tipo celular, los miocitos cardíacos están rodeados de una bicapa lipídica en la que se encuentran inmersas gran diversidad de proteínas con variadas funciones biológicas. Esta membrana constituye el límite celular y conforma una barrera de permeabilidad selectiva entre citosol y espacio extracelular.



**Figura 5. Túbulos T.** (A) Reproducción de una figura de Nystrom G. (1897) mostrando miocardio de conejo inyectado con tinta de la India. (B) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia que muestra los túbulos T en un miocito de rata aislado y teñido con el marcador de membrana Di-8 ANNEPS (panel superior). En el panel inferior se puede observar la reconstrucción 3D a partir de 30 secciones de 0,2  $\mu\text{m}$ . (Guo A, 2013).

El sarcolema presenta profundas invaginaciones perpendiculares a la superficie celular cuya integridad es de gran relevancia para el AEC normal: los túbulos transversos o Túbulos T (TT). Las primeras evidencias de estas estructuras tienen más de un siglo y fueron reveladas por un estudio pionero llevado a cabo por Nyström en 1897. Utilizando microscopía de luz blanca [Nyström G, 1897] y valiéndose de tinta de la India para marcar el espacio extracelular, pudo observar líneas oscuras que cruzaban las fibras cardíacas con un intervalo regular (**Figura 5 A**). Análisis ultra estructurales muestran que la mayor parte del volumen de los túbulos T (60%) se encuentra a nivel de la línea Z del sarcómero y el 40% restante en otros sitios a lo largo de las miofibrillas [Soeller C, 1999] (**Figura 5 B**). También han sido reconocidos túbulos longitudinales que relacionan unos 5 túbulos transversos contiguos [Ferrantini C, 2013]. La presencia del componente longitudinal, ha dado lugar a la denominación moderna de Sistema Tubular Axial-Longitudinal (STAL). El STAL corresponde aproximadamente a la tercera parte del total de la superficie de la membrana [Stewart JM, 1978]. En conjunto estas invaginaciones permiten la rápida propagación del potencial de acción desde la superficie, al interior de la célula en menos de 40 mseg [Hill AV, 1949]. En el presente texto se utilizará de forma indistinta la denominación TT y STAL.

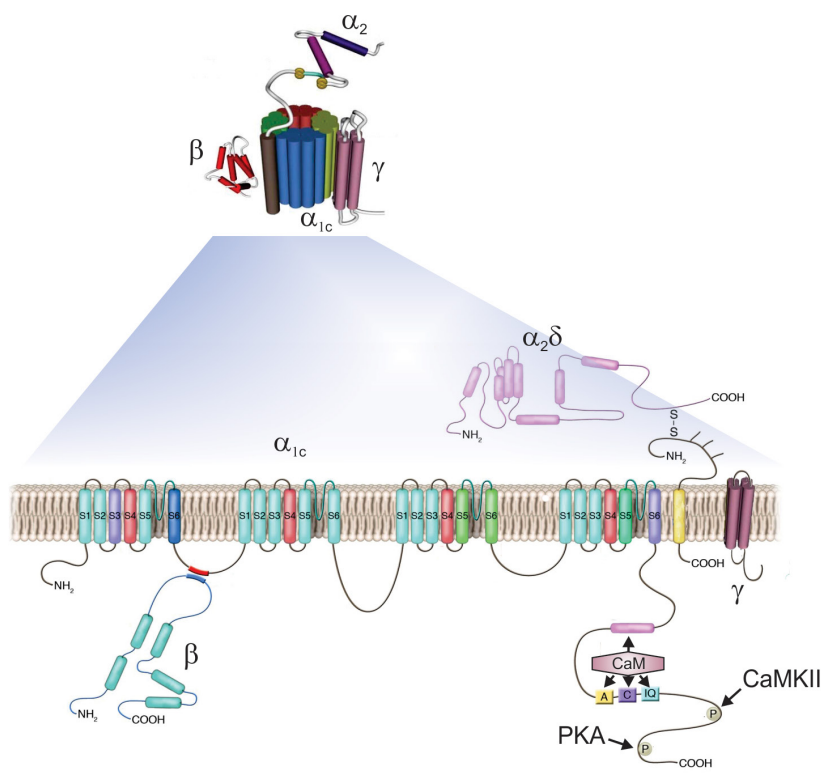
Como veremos más adelante, es la despolarización a través del STAL, la que conduce a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir del RS desencadenando la contracción del miocito cardíaco. La relación estructural entre STAL y RS, fue propuesta alrededor de los ´60s a partir de un trabajo llevado a cabo por Franzini-Armstrong y Porter en músculo esquelético. Sus estudios determinaron que el STAL era una continuidad de la membrana plasmática independiente del RS pero estrechamente relacionada con el mismo [Franzini-Armstrong C, 1964].

En los miocitos ventriculares de mamífero aproximadamente el 80% de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por voltaje y el 63% de la proteína que conforma el NCX se encuentran en los TT [Despa S, 2003, Brette F, 2004;]. Estos túbulos establecen una estrecha relación con el RS permitiendo el CICR.

## CANALES DE $\text{Ca}^{2+}$ OPERADOS POR VOLTAJE

El estudio de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (voltage dependent calcium channels, VDCCs) se desarrolló tempranamente durante la década de los '50 y se considera a Bernard Katz, Susumu Hagiwara y Harald Reuter como los pioneros en este campo [Dolphin AC, 2006]. La caracterización molecular de estos canales se produjo tres décadas más tarde como resultado de los estudios de Campbell KP (1988).

Los VDCCs son complejos proteicos de múltiples subunidades que forman en su conjunto un canal



**Figura 6. Esquema de la estructura del LTCC cardíaco.** El canal está constituido por la unidad formadora del poro  $\alpha_{1c}$  y por proteínas accesorias  $\beta$ ,  $\alpha_{2\delta}$ ,  $\gamma$  y Calmodulina (CaM). También se observan los sitios consenso de fosforilación para CaMKII y proteína quinasa A (PKA). Ambas fosforilaciones son capaces de incrementar el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  por este canal (Modificado a partir de Bodi I, 2005).

funcional (Figura 6). La subunidad principal se denomina  $\text{Cav}\alpha_1$  y consiste en cuatro dominios compuesto por seis segmentos transmembrana (S1 a S6). A lo largo del canal se reconocen múltiples sitios de unión para diferentes subunidades auxiliares ( $\beta$ ,  $\alpha_{2\delta}$  y  $\gamma$ ) responsables de su modulación y regulación (Figura 6).

En la subunidad  $\text{Cav}\alpha_1$  los segmentos S5 y S6 de cada dominio son responsables de la constitución del poro, mientras que los bucles de unión entre dichos segmentos poseen residuos de ácido glutámico que le confieren la gran selectividad al  $\text{Ca}^{2+}$  [Yang J, 1993]. Los segmentos S4 contienen lisinas y argininas cargadas positivamente y de ellos depende la regulación del canal por



voltaje [Bezanilla F, 2002]. Finalmente, el segmento S6 también participa en la inactivación del canal [Stotz SC, 2004].

Al menos diez tipos de Cav $\alpha$ 1 han sido identificados [Catterall WA, 2000] y depende del tipo de subunidad presente la intensidad de corriente que atraviesa el canal y el valor del voltaje en que éste se activa. Desde el punto de vista electrofisiológico, los VDCCs cardíacos pertenecen a dos grandes familias: canales tipo-T (cinética de activación transitoria rápida) y tipo-L (por “Long lasting”, cinética de activación lenta).

Los canales de Ca $^{2+}$  tipo-T han sido localizados predominantemente en las regiones cardíacas con propiedades de marcapaso, como el nódulo sino-auricular, el auriculoventricular y el sistema de fibras de Purkinje. Su ubicación indica que la corriente que los atraviesa participa en la génesis de la despolarización diastólica espontánea presente en la fase 4 del potencial de acción de las células marcapaso [Mesirca P, 2015]. En acuerdo con esto, estudios en ratones transgénicos que presentan inactivación genética del canal de Ca $^{2+}$  tipo-T Cav3.1 evidencian bradicardia moderada y disminución de la conducción auriculoventricular [Mangoni ME, 2006].

Los canales de Ca $^{2+}$  tipo-L (LTCC), son llamados también receptores de dihidropiridinas por su sensibilidad a las 1,4 dihidropiridinas, como la nifedipina. Estos canales están asociados al transporte de Ca $^{2+}$  a través de la membrana plasmática y del STAL en proximidad del RS y por lo tanto, participan en el mecanismo que lleva a la contracción de los miocitos. Sin embargo, los canales de Ca $^{2+}$  tipo-L también se encuentran implicados en el automatismo cardíaco, como lo demostró la aparición de bradicardia inducida por el uso de dihidropiridinas en el ratón anestesiado [Lande G, 2001].

En el miocito ventricular adulto, el principal canal tipo-L expresado es el Cav1.2 $\alpha$ 1c. Los extremos N y C terminal son citoplasmáticos, siendo el C fundamental para determinar la localización del canal en la membrana plasmática [Fang K, 2011], y la interacción con proteínas moduladoras tales como la calmodulina (CaM), CaMKII y PKA [Anderson ME, 2007; Harvey RD, 2013]. La

pérdida de dicho segmento determina una reducción importante de la corriente a través del canal [Fu Y, 2011].

La apertura de estos canales acontece cuando el potencial de membrana se despolariza y alcanza aproximadamente los -20 mV. Una vez abiertos, muestran una elevada conductancia para luego sufrir una lenta inactivación dependiente de voltaje y de  $\text{Ca}^{2+}$  [Treinys R, 2008; Best JM, 2012]. Esto, limita la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa en cada potencial de acción para inducir el CICR. Se ha descrito también una facilitación mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  y una inactivación dependiente de la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a CaM [Halling DB, 2005].

Raramente los LTCC tienen aperturas espontáneas, y cuando lo hacen, provocan aumentos locales de  $\text{Ca}^{2+}$  subsarcolemal que constituyen lo que se ha denominado " $\text{Ca}^{2+}$  sparklets". Las áreas con  $\text{Ca}^{2+}$  sparklets persistentes son producto de la apertura de al menos 6 LTCC adyacentes [Navedo MF, 2010]. Aunque se requieren más investigaciones para determinar su verdadero rol fisiológico, estarían vinculados a mecanismos de señalización celular que requieren incrementos localizados de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  subsarcolemal.

Estos canales tienen además otras funciones que incluyen: el control de la duración del PA, la regulación humoral (participando en la liberación de péptido natriurético auricular, PNA) y la regulación de la expresión génica [Best JM, 2012; Shaw RM, 2013].

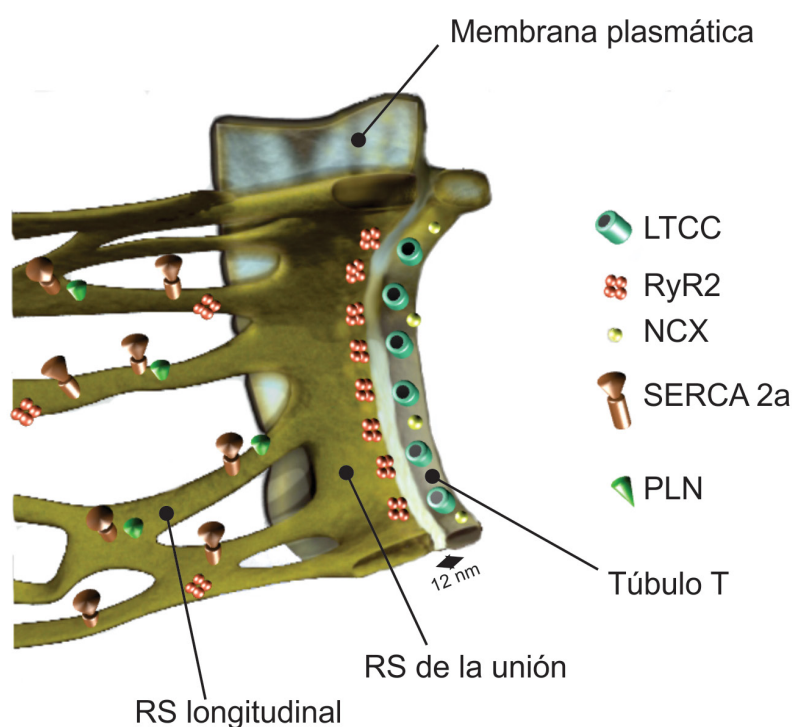
## **RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (RE) Y RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO (RS)**

El RE es una organela de importancia crítica para todas las células eucariotas. Consiste en un sistema continuo de membranas que puede ser dividido en al menos tres dominios que desarrollan distintas funciones [Voeltz GK, 2002]:

- 1.- El RE rugoso, sitio donde las proteínas integrales de membrana y de secreción, son sintetizadas. Esto constituye aproximadamente el 30% de las proteínas de la célula [Minamino T, 2010].

2.- El RE de transición, lugar desde donde los polipéptidos recién sintetizados inician su camino a través de la vía secretora.

3.- El RE liso, región especializada en determinadas vías metabólicas como la biosíntesis de lípidos y zona donde se almacena la mayor parte del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, alcanzando concentraciones entre 50 a 250  $\mu\text{M}$  [Bers DM, 2001].



**Figura 7. Regiones del RS y sus principales proteínas.** Se representan en el esquema las principales divisiones del RS y la distribución de las proteínas involucradas en el AEC. Los RyR2 predominan en el RS de unión, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (LTCC) y el NCX en el Túbulo T. En el RS longitudinal abundan las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  SERCA2a, acompañadas de su principal proteína reguladora, fosfolamban (PLN) (véase más adelante).

El RS, se describe habitualmente como una forma especializada del RE liso, que alcanza su máxima expresión en las células musculares, y cuya función es el secuestro y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el RS pueden ser reconocidas diferentes zonas (**Figura 7**):

El *RS reticular* (network RS) está formado por túbulos interconectados que cruzan entre los TT rodeando a las miofibrillas y a las mitocondrias.

*RS corbular* (fr. Corbeille, canasto) es una protrusión del RS reticular que expresa RyR2 pero que no interacciona con el sarcolema. Algunos autores se refieren al conjunto del reticular y el corbular como RS Longitudinal (LRS) caracterizándose éste por un claro predominio de SERCA2a [Drago GA, 1998].

El *RS de la unión* o *jRS* (juntional RS) se encuentra en íntima aposición con los TT. El compartimiento delimitado por ambas estructuras ( $\approx 12$  a 15 nm), es la hendidura diádica y corresponde al sitio donde interactúan los LTCC localizados en el TT y los RyR2 del jSR produciendo el CICR [Bers DM, 2002]. Las hendiduras

diádicas se hallan en grupos a intervalos irregulares a lo largo de las líneas-Z y su tamaño y número es variable [Vega AL, 2011].

### Ca<sup>2+</sup>-ATPasa DEL RS (SERCA2a)

Una vez ocurrida la contracción del miocito cardíaco, el Ca<sup>2+</sup> debe ser removido del citosol para dar comienzo a la relajación muscular. En los mamíferos el mecanismo más importante en este proceso es la recaptura del Ca<sup>2+</sup> al interior del RS, por la bomba de Ca<sup>2+</sup> llamada SERCA [Bers DM, 2002], flujo que se realiza en contra del gradiente de concentración del ión. Actualmente se conocen 3 genes que codifican las bombas dando lugar a los subtipos SERCA 1, 2 y 3, a partir de las cuales, por splicing alternativo se generan al menos 10 isoformas [Periasamy M, 2008]. SERCA pertenece a la familia de ATPasas tipo P [Sweadner KJ, 2001], llamada así por dar lugar a un intermediario fosforilado durante el ciclo de transporte.

Estructuralmente es una proteína transmembrana que posee una masa molecular de 110

kDa de la cual el

70% se localiza

del lado

citosólico de la

membrana. Se

reconocen tres

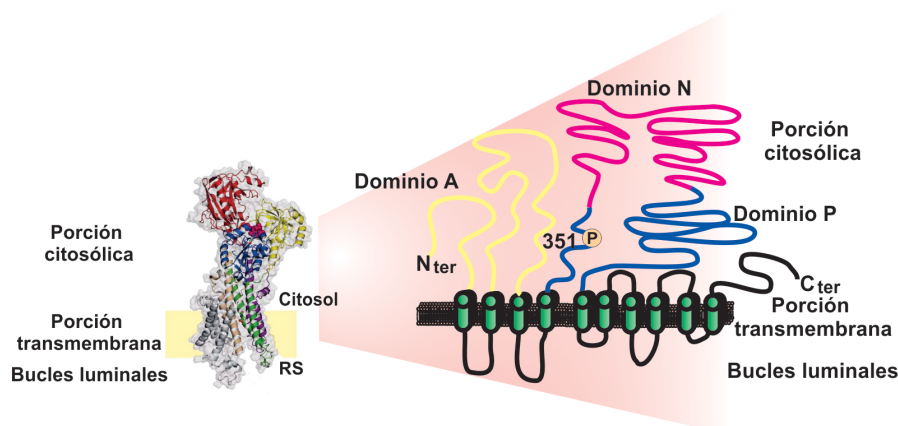
regiones distintas

en esta proteína:

una cabeza

citoplasmática, la porción de hélices transmembrana (donde se encuentran los sitios de unión al Ca<sup>2+</sup>) y los bucles luminales (Figura 8). A su vez, la porción

citoplasmática reconoce 3 dominios: un dominio de unión de nucleótidos (N) al que se une el ATP, un dominio de fosforilación (P) donde se localiza un residuo

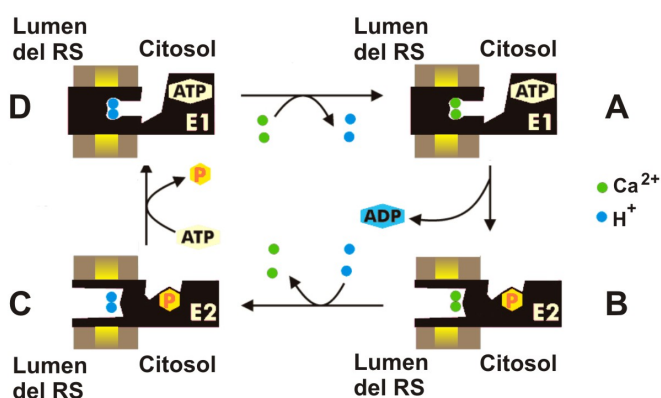


**Figura 8. Estructura tridimensional y desplegada de SERCA.** Se representan los tres dominios A, N, P y los segmentos transmembrana. Se señala la posición aproximada del residuo fosforilado durante el ciclo de transporte (Aspartato 351) (Modificado de Olesen C, 2007 y Shao CH, 2011).

altamente conservado de ácido aspártico que es fosforilado durante los ciclos de transporte y el dominio actuador A (o accionador) (Olesen C, 2007) (Figura 8).

En corazón se expresan los subtipos SERCA2a, SERCA2b y SERCA2c [Vangheluwe P, 2006; Periasamy M, 2008; Kranias EG, 2012] diferenciados por el extremo C terminal, siendo el primero el más abundante en miocardio. A través de herramientas genéticas se ha confirmado la crucial importancia de SERCA2a, en el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  cardíaco. En primer lugar la ausencia absoluta de expresión de esta proteína (SERCA2<sup>-/-</sup>) conduce a la muerte temprana durante el desarrollo [Periasamy M, 1999], mientras su sobreexpresión en ratones aumenta la contractilidad y la relajación sin causar otras alteraciones significativas [Baker DL, 1998]. La deficiencia heterocigota (ratones SERCA2<sup>+/-</sup>) permite obtener animales viables que tienen menor contractilidad y carga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. La función cardíaca de estos ratones es normal en condiciones basales, pero presentan un deterioro significativo cuando se los expone a situaciones de sobrecarga hemodinámica [Schultz J, 2004].

Finalmente, la inhibición específica del mecanismo de splicing que da lugar a la producción de SERCA2a, sin modificación de la producción de otras isoformas, conduce a mayor mortalidad embrionaria (40%) y los animales que sobreviven evidencian moderada hipertrofia cardíaca concéntrica y deterioro en la función diastólica y sistólica. Por lo tanto, la función de SERCA2a es crucial para el miocito cardíaco y sólo puede ser parcialmente compensada por otras isoformas [Hexen M, 2001].



**Figura 9. Ciclo de bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  por la SERCA 2a.** (A) Los sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  se localizan cerca del centro de la porción transmembrana siendo sólo accesibles desde el citosol (estado E1). (B) Tras la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a los sitios citoplasmáticos se produce la hidrólisis del ATP y la bomba se fosforila en el aspartato de la posición 351. Este fenómeno inicia una serie de cambios conformacionales que determinan que el  $\text{Ca}^{2+}$  pierda el contacto con el citosol a la vez que gana acceso al lumen del RS (estado E2) hacia donde es liberado al perder la bomba afinidad por el ión. (C) Este sitio posteriormente es ocupado por protones. La liberación del fosfato de la SERCA2a y la unión de una nueva molécula de ATP (D) da lugar nuevamente al estado conformacional E1 liberando los protones al citosol para dejar libres los sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  y comenzar un nuevo ciclo (A) [Olesen C, 2007; Levy D, 1990].

El proceso de transporte del  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de SERCA se basa en cambios cíclicos entre dos estados conformacionales principales que se denominan E1 y E2. Este mecanismo consta de múltiples pasos que se resumen en la **Figura 9**.

La cantidad de iones  $\text{Ca}^{2+}$  que remueve la SERCA2a del citosol durante el proceso de relajación varía en distintas especies [Bers DM, 2002]. Así, en el miocardio de conejo (similar al humano), SERCA2a es responsable de recapturar aproximadamente el 70% del  $\text{Ca}^{2+}$  utilizado en el proceso de la contracción mientras que, en el miocardio de rata y ratón, la retoma es del 92% debido a que presentan mayor número de bombas. La abundancia de SERCA2a permite una mayor velocidad de relajación, de modo tal que la recaptación dura pocos milisegundos. Esto explica las frecuencias cardíacas superiores a 500 latidos/minuto presentes por ejemplo en los ratones.

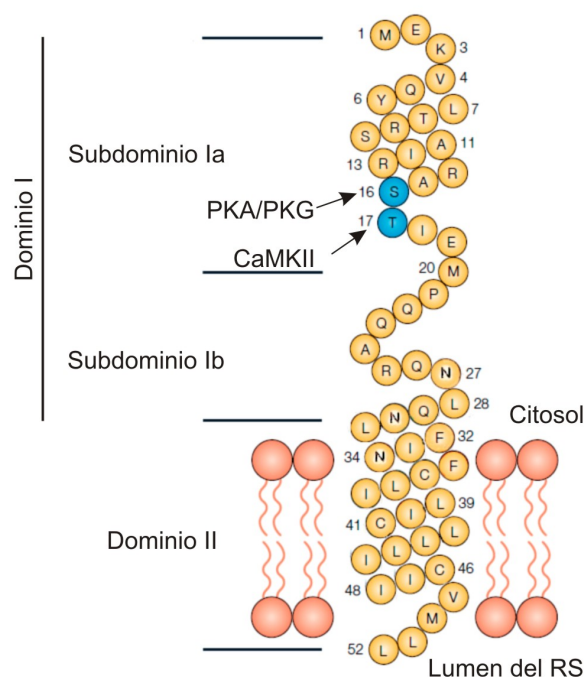
Al igual que la mayoría de las proteínas que intervienen en el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la función de SERCA2a se haya estrictamente regulada. Entre las proteínas descritas que cumplen esta función se encuentran: a) del lado luminal, la proteína unidora de  $\text{Ca}^{2+}$  rica en histidina (HRC) y la calreticulina. b) del lado citosólico, fosfolamban (PLN), S100A y sarcolipina las cuales interaccionan con los dominios transmembrana o la porción citosólica de la SERCA2a. [Kranias EG, 2012].

En los siguientes párrafos se describirá detalladamente la proteína fosfolamban (PLN) estrechamente relacionada con nuestro objeto de estudio.

## **FOSFOLAMBAN (PLN)**

Como se mencionó previamente, la actividad de la SERCA2a se encuentra modulada por múltiples proteínas. Sin embargo PLN, es la que ejerce un control más significativo. Su nombre deriva del griego “fosfato” y “lambano” que significa “que recibe fosfatos” [Katz AM, 1998]. Esta proteína puede hallarse en forma de monómero o bien constituyendo estructuras oligoméricas.

El monómero de PLN (**Figura 10**) está constituido por 52 aminoácidos; su secuencia y estructura ya han sido determinadas y posee un peso molecular de 6080 Da. Estructuralmente puede dividirse en dos dominios: A) un dominio I (hidrofílico) que abarca los aminoácidos 1 al 30 y que se divide a su vez en dos subdominios: **la** (1-20) y **lb** (21-30). El **la** es una hélice alfa que presenta tres sitios fosforilables: Serina10 fosforilado por la proteína quinasa C (PKC) sin relevancia fisiológica conocida,



**Figura 10. Estructura del monómero de PLN.**

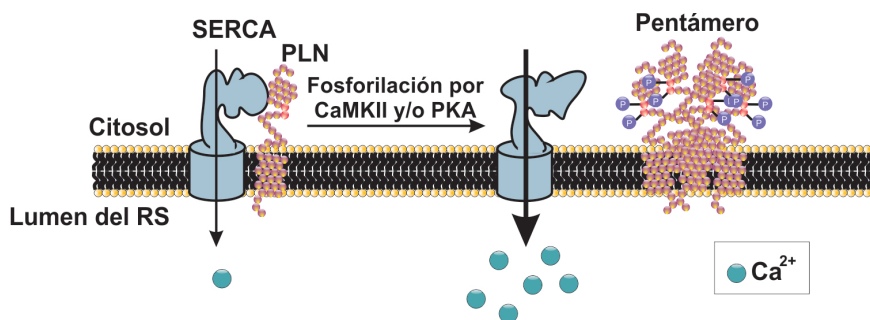
(Modificado de MacLennan DH, 2003).

Serina16 (S16) fosforilado por la proteína quinasa A (PKA) y Treonina17 (T17) fosforilado por CaMKII [Simmerman HK, 1986; Drago GA, 1994]. Si bien se ha demostrado indirectamente la fosforilación del sitio S16 por la proteína quinasa G (PKG) su relevancia fisiológica in vivo aún debe ser esclarecida [Huggins JP, 1989]. El subdominio **lb** corresponde al pie o tallo. B) El dominio II (hidrofóbico) comprende los aminoácidos 31 a 52 conformando una hélice alfa transmembrana que ancla esta proteína a la membrana del RS. Dentro de esta región han sido identificados residuos de cisteína, leucina e isoleucina que son críticos para la formación del homopentámero (ver luego) [MacLennan DH, 1998]. Esta zona participa además, en el efecto inhibitorio de PLN sobre la SERCA, [Kimura Y, 1997].

Una característica destacada de PLN es que tiene una tendencia natural a formar homopentámeros, resistentes a la acción del detergente dodecil sulfato sódico (SDS) a temperatura ambiente. De este modo, cuando se estudia esta proteína a través de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, habitualmente se encuentra en esa conformación (80-90%) [MacLennan DH, 2003] de aproximadamente 25 kDa.



La PLN desfosforilada se presenta fundamentalmente bajo la forma de monómero y es la que tiene capacidad de interaccionar en



**Figura 11. Regulación de la SERCA2a por PLN.** En su estado monomérico PLN se une a la SERCA2 disminuyendo su actividad. La fosforilación de PLN conduce a la formación de pentámeros finalizando el efecto inhibitorio. (Adaptado de Kranias EG, 2012).

forma directa con la SERCA2a reduciendo su actividad. Esto ha sido comprobado a través de experimentos de mutagénesis, los cuales mostraron que aquellas mutaciones que favorecen el estado monomérico sobre el oligomérico se asocian a una mayor inhibición de la SERCA2a [Kimura Y, 1997]. Se ha estimado que en condiciones normales *in-vivo*, aproximadamente un 40% del total de las SERCA2a se encuentra regulado por PLN (Brittsan AG, 2000).

La principal consecuencia de la formación del heterodímero SERCA2a/PLN es disminuir la afinidad de SERCA2a por el ion Ca<sup>2+</sup> [Cantilina T, 1993; Mattiazzi A, 2014], siendo esta inhibición de tipo no competitivo. PLN ejerce su efecto inhibitorio uniéndose a SERCA2a en su conformación E2 (estado de baja afinidad por el Ca<sup>2+</sup>) prolongando su permanencia en ese estado [Cantilina T, 1993] (Figura 11). Algunos estudios sugieren que los sitios de interacción del Ca<sup>2+</sup> y PLN con la SERCA2a serían mutuamente excluyentes y por lo tanto la inhibición de la bomba estaría mediada directamente por impedir la unión de este ion a la misma. [Chen Z, 2003].

La fosforilación de fosfolamban por PKA o CaMKII libera a la SERCA2a de su inhibición lo cual incrementa 2 a 3 veces la actividad de esta bomba. El aumento resultante de la actividad de la SERCA2a incrementa la retoma de Ca<sup>2+</sup> hacia el RS y por lo tanto la velocidad de relajación. Esto conduce a un aumento en la carga del RS que se traduce en una mayor contractilidad. Estos fenómenos explican la respuesta inotrópica y lusitrópica positiva frente a la estimulación beta adrenérgica [Mattiazzi A, 2014].

Nuestro conocimiento sobre la participación de PLN en la regulación del AEC en situaciones fisiopatológicas se ha visto nutrido por el desarrollo de múltiples modelos genéticos de ablación, sobreexpresión y mutaciones de esta proteína. La sobreexpresión de PLN en ratones, se asocia a una menor actividad de la SERCA2a, menor carga del RS y disminución de la contractilidad con enlentecimiento de la relajación [Kadambi VJ, 1996]. Por el contrario, la eliminación completa de PLN, (ratones PLN knock-out), produce un aumento de la afinidad de la SERCA2a por el  $Ca^{2+}$ , asociado a un incremento de la actividad contráctil y de la velocidad de relajación [Luo W, 1994].

La disponibilidad de ratones que presentan mutaciones puntuales en los distintos sitios de fosforilación, ha permitido clarificar la participación de cada uno de ellos en la regulación de la actividad de la SERCA2a. Cuando el sitio S16 es mutado a alanina (S16A) y por lo tanto no puede ser fosforilado por PKA, se reduce significativamente la respuesta máxima a la estimulación  $\beta$ -adrenérgica [Chu G, 2000]. En estos ratones, se pierde además la fosforilación del sitio T17 de PLN que ocurre habitualmente en respuesta a la estimulación por catecolaminas. Esto sugiere que, en presencia de estimulación  $\beta$ -adrenérgica la fosforilación del sitio S16 es un prerrequisito para la fosforilación de T17 [Chu G, 2000; Said M, 2002]. Cuando solamente el sitio T17 de PLN (T17), es mutado a alanina (T17A) no se afecta la respuesta máxima a la estimulación  $\beta$ -adrenérgica confirmando que ella depende fundamentalmente de S16 [Luo W, 1998]. El residuo T17 puede sin embargo, fosforilarse independientemente de S16 ante incrementos de  $Ca^{2+}$  intracelular e inhibición de fosfatasas por acidosis, condiciones ambas que caracterizan a la injuria por isquemia y reperfusión [Vittone L, 1998; Vittone L, 2002].

## RECEPTOR DE RIANODINA (RyR)

Los receptores de rianodina (RyR) son los canales iónicos más grandes que se han identificado hasta el momento y se encuentran localizados predominantemente en la membrana del RS. El nombre de RyR guarda relación

con la elevada afinidad del canal por un alcaloide vegetal llamado rianodina, que se obtiene de la planta *Ryania speciosa* [Inui M, 1987]. La importancia de estos canales en la fisiología y el desarrollo del corazón, se pone de manifiesto en experimentos en los cuales se realiza la ablación completa de la proteína, intervención que conduce a la muerte en etapas tempranas del desarrollo embrionario [Takeshima H, 1998]. En los mamíferos han sido descritas hasta la fecha tres isoformas de RyR cuya denominación, RyR1, RyR2 y RyR3 se debe al orden en el cual fueron descubiertas [Lanner JT, 2012]. Clásicamente se acepta que RyR1 se expresa predominantemente en el músculo esquelético, siendo el RyR2 la forma mayoritariamente cardíaca, en tanto que RyR3 fue aislado de cerebro, más específicamente de neuronas corticales e hipocampales. Cabe aclarar, sin embargo, que ninguna de las isoformas es tejido específica [Lanner, 2012].

El RyR2 cardíaco es un gran complejo macromolecular que consiste en un homo-tetrámero conformado por subunidades que poseen aproximadamente 5000 aminoácidos y una masa molecular de 565 kDa [Bers, 2001, 2004]. Este complejo tiene una pequeña porción transmembrana que corresponde al extremo C<sub>ter</sub> de los monómeros (10% del total) y atraviesa la membrana entre 4 y 10 veces, según los distintos modelos, conformando un poro que permite la salida de Ca<sup>2+</sup> del RS [Tinker A, 1995]. El 90% restante del RyR2 protruye dentro del citosol, observándose en las imágenes de microscopía electrónica, un aspecto similar al de un hongo. El dominio N<sub>ter</sub> citoplasmático, tiene la capacidad de regular el mecanismo de compuerta de la porción C<sub>ter</sub> y actúa como anclaje para múltiples proteínas reguladoras que contribuyen a crear un verdadero “complejo de señalización macromolecular” [Zalk R, 2007]. Se incluyen en este complejo las siguientes proteínas: FK-506 (calstabinina o FKBP12.6), homer, S100A1, sorcina, PKA y su proteína de anclaje mAKAP, calmodulina (CaM), CaMKII, fosfatasa 1 y 2A y fosfodiesterasa 4D3. El lado luminal del RyR2 se encuentra asociado a otras proteínas con clara influencia en el funcionamiento del canal: juntina, triadina, calsecuestrina y la proteína rica en histidina (HRP) [Camors E, 2014] (**Figura 12**).

Los RyR2 están organizados en el miocito formando grupos (racimos o "clusters") que representan la unidad elemental de liberación de  $Ca^{2+}$  [Hiess F, 2015]. Cuando el RyR2 es aislado y posteriormente restituido en bicapas lipídicas, se observa que, al ser expuesto a concentraciones de  $Ca^{2+}$  del lado citoplasmático (cis) de la bicapa,

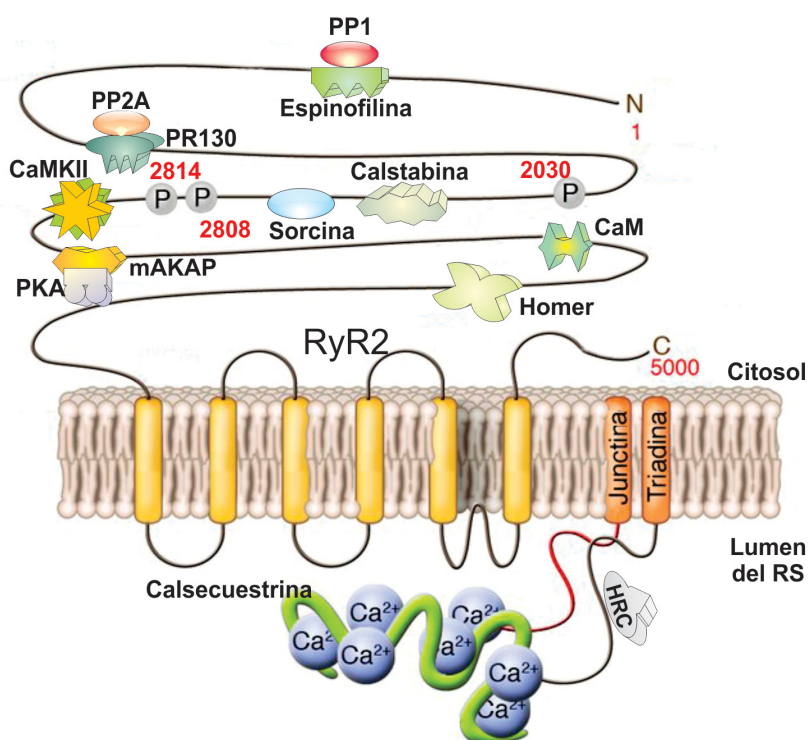


Figura 12. Esquema ilustrativo que muestra un monómero de RyR2 y sus proteínas asociadas.

equivalentes a las que se encuentran en diástole (100nM), la probabilidad de apertura del canal ( $P_o$ ) es cercana a cero [Meissner G, 2004]. Si bien se considera que el canal se encuentra cerrado en este período, pequeños eventos de liberación de  $Ca^{2+}$  se presentan de manera estocástica en ausencia de influjo de  $Ca^{2+}$  por los LTCC, originando las denominadas chispas de  $Ca^{2+}$  o sparks (en inglés) [Cheng H, 1993] (Figura 13). Para la génesis de las mismas se requiere al menos la apertura sincronizada de 6 RyR2 [Rueda A, 2014].

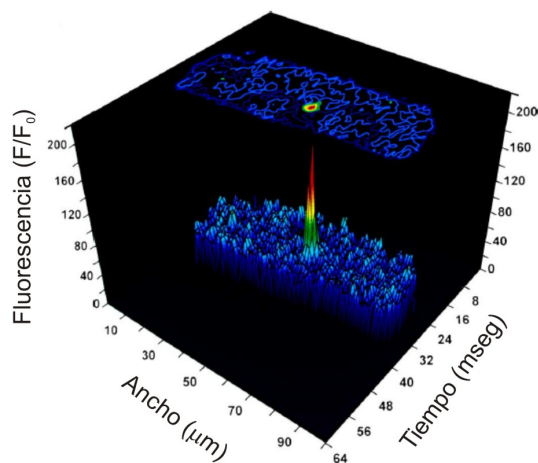


Figura 13. Chispa de  $Ca^{2+}$ . Gráfico de contorno en 3D de la fluorescencia obtenida con el indicador de  $Ca^{2+}$  Fluo-3 que muestra un evento de liberación espontánea de  $Ca^{2+}$  (spark).

Los canales de RyR2 se abren a concentraciones de  $Ca^{2+}$  citoplasmáticas entre 1 y 10  $\mu M$  y son inhibidos por concentraciones más elevadas de 1 a 10 mM

[Fill M, 2002]. Esta respuesta al  $\text{Ca}^{2+}$  sugiere la presencia de un sitio activador con alta afinidad y un sitio inhibidor con baja afinidad para el ión que estarían localizados en la faz citoplasmática del RyR2 [Meissner G, 2004].

Siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  el agonista endógeno principal del RyR2, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el CICR determinaría en principio, la liberación de más  $\text{Ca}^{2+}$  y un mecanismo de retroalimentación positiva que podría mantener al canal abierto indefinidamente y vaciar las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS [Stern MD, 2004]. Sin embargo los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  lumbinales, también parecen desempeñar un rol modulador de la apertura o cierre de los RyR2. En primer lugar, el agotamiento de las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal del RS induce la desactivación del RyR2 habiéndose propuesto que este mecanismo funcionaría como un freno a la mencionada naturaleza auto-regenerativa del CICR [Rueda A, 2014; Kunitomo Y, 2011]. Por otra parte, cuando las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del RS se elevan por encima de un nivel crítico, los canales de RyR2 comienzan a abrirse y se incrementa la pérdida diastólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , mecanismo que ha sido llamado *Store Overload-Induced Calcium Release* (SOICR) [Chen W, 2014]. La base biológica de este fenómeno es poco clara, pero se acepta la existencia de un sitio luminal sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  que aumenta su probabilidad de apertura ( $P_o$ ). Dos hallazgos experimentales sustentan esta afirmación: en primer lugar el RyR2 responde al aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal aún en ratones carentes de calsecuestrina (considerada hasta entonces el único mecanismo sensor del  $\text{Ca}^{2+}$  presente en el interior del RS) [Chen W, 2014]. En segundo lugar, la descripción de una mutación del RyR2 (A4860G) que provoca una disminución de la respuesta del canal al  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, sin afectar la estimulación por  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel citosólico [Jiang D, 2007].

Además de la modulación ejercida por el  $\text{Ca}^{2+}$  y las proteínas accesorias, el RyR2 puede ser blanco de múltiples modificaciones post-traduccionales entre las que podemos mencionar las oxidaciones reversibles e irreversibles del canal capaces de modificar su función [Donoso P, 2013]. El RyR2 también es susceptible a sufrir fosforilación, como revelaron los estudios de Takasago et al. (1989) y el estudio de este mecanismo de regulación es uno de los objetivos fundamentales del presente trabajo de tesis.

Análisis de simulación computacional, basados en las secuencias consenso de fosforilación conocidas, muestran que el RyR2 puede ser fosforilado por lo menos en 100 residuos por la acción combinada de la PKA, CaMKII, PKG, y PKC, entre otras quinasas [George CH, 2008].

Experimentalmente se han identificado al día de hoy, tres sitios de fosforilación en el canal de RyR2. El primero en ser descrito fue el residuo Serina 2808 (S2808) en el ratón y el humano (S2809 en la rata y el conejo) reportado por Witcher en 1991. Es considerado un sitio mayormente dependiente de PKA [Camors E, 2014]. Una particularidad de este sitio es su elevada fosforilación constitutiva basal (50 al 75%) [Huke S, 2008] lo que ha conducido a dudar del papel regulador que pudiera cumplir la variación en su fosforilación.

El segundo sitio de fosforilación fue descrito por X. Wehrens en 2004: el Serina 2814 (S2814) en el humano y el ratón (S2815 en la rata y el conejo), fosforilado por CaMKII. A diferencia del sitio 2808, el sitio S2814 presenta bajos niveles de fosforilación basal. Actualmente se dispone de ratones transgénicos con este residuo mutado a Alanina (ratones S2814A) en los cuales la posibilidad de fosforilación se encuentra abolida [Chelu, 2009] y ratones en los que este residuo está sustituido por Ácido Glutámico simulando una fosforilación constitutiva [van Ortt, 2010]. Estos animales serán determinantes en la comprobación de la hipótesis del presente trabajo de Tesis.

Por último, el residuo Serina 2030 (S2030) en roedores (S2031 en conejos y humanos) fue descrito en 2005 por Xiao B. Este sitio es blanco de la proteína quinasa A (PKA) al menos *in vitro* [Camors E, 2014].

¿Cuáles son las consecuencias funcionales de la fosforilación de dichos residuos? En primer lugar nos centraremos en el rol desempeñado por la fosforilación del sitio S2808 que hasta el día de hoy, continúa siendo controvertido [Backx PH, 2014].

Marx y colaboradores demostraron que la hiperfosforilación del RyR2 mediada por PKA en el residuo S2808 incrementaba la probabilidad de apertura del canal, producto del desplazamiento de una proteína estabilizante, la calbindina (o FKBP12.6) [Marx SO, 2000]. La disociación de calbindina



favorecería la pérdida diastólica de  $\text{Ca}^{2+}$  (calcium leak) dando lugar a chispas y a otros eventos no regulados de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS. Este mecanismo podría explicar por qué durante la insuficiencia cardíaca, el aumento compensador del tono simpático y la activación de PKA, producen depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, deterioro contráctil y arritmias. [Wehrens XHT, 2005]. Sin embargo, la generación de un ratón con una mutación en el sitio 2808 que reemplaza la Serina por Alanina, impidiendo así su fosforilación (S2808A), no confirmó esa suposición ya que, en estos ratones, la ausencia de fosforilación no los protegió de la disfunción post-infarto. Esto llevó a concluir que la fosforilación del S2808 sería irrelevante en el desarrollo de esa patología [Zhang H, 2012]. En un modelo transgénico de cardiomiopatía en ratones S2808A, la falta de fosforilación del sitio no mejoró sino por el contrario aceleró el deterioro estructural y funcional en estos animales [Liu B, 2014]. Este hallazgo también apoya la hipótesis de la ausencia de participación de la hiperfosforilación del RyR2 en la progresión hacia la insuficiencia cardíaca.

Adicionalmente Shan J, y col. demostraron que la fosforilación del RyR2 por PKA en S2808 incrementaba el inotropismo y el cronotropismo en respuesta al isoproterenol sugiriendo que esta fosforilación tendría un papel en la respuesta simpática al estrés (“fight or flight response”). [Shan J, 2010]. Estos resultados no fueron sin embargo, validados por otros autores [MacDonell SM, 2008]

Por otro lado, la desfosforilación de este sitio por fosfatasas exógenas resultó en una mayor actividad del canal con aumento en la liberación diastólica de  $\text{Ca}^{2+}$  [Terentyev D, 2003].

De lo expuesto se desprende que aún se necesitan más estudios para establecer el verdadero rol de la fosforilación/desfosforilación del sitio S2808 en situaciones tanto fisiológicas como patológicas.

Consideraremos a continuación los aspectos más relevantes relacionados con la fosforilación del sitio S2814 del receptor de RyR2, blanco de la CaMKII.

Las primeras evidencias directas de la influencia de esta quinasa sobre el RyR2, provienen de experimentos realizados utilizando canales reconstituidos en bicapas lipídicas [Witcher DR, 1991]. Estos revelaron que el agregado de CaMKII

producía aumento de la  $P_o$  e incremento del tiempo de apertura. La sobreexpresión de CaMKII $\delta$ c (la principal isoforma cardíaca) daba lugar a manifestaciones funcionales y bioquímicas típicas de la insuficiencia cardíaca. Se observó una disminución de la carga de  $Ca^{2+}$  del RS y un aumento en la frecuencia de chispas producto de la existencia de una pérdida de  $Ca^{2+}$  diastólica incrementada, que pudo ser bloqueado utilizando un inhibidor de la CaMKII, el KN-93 [Maier LS, 2002].

En el año 2004 se realiza la inmunodetección del sitio S2815 y se establece que su fosforilación activa el canal, por un mecanismo de sensibilización dependiente de  $Ca^{2+}$  [Wehrens XH, 2004].

La obtención de ratones transgénicos en los que se había sustituido el residuo Serina por Alanina impidiendo su fosforilación (S2814A) [Chelu MG, 2009] revelaría, años más tarde, que, tanto *in-vivo* como *in-vitro*, se bloqueaba el denominado efecto Bowditch, también llamado relación fuerza frecuencia. Por lo tanto, en estos animales se pierde el ascenso del  $Ca^{2+}$  citosólico característico de la respuesta al incremento de la frecuencia, no pudiendo adaptar el volumen minuto cardíaco a la demanda del ejercicio [Kushnir A, 2010].

Los datos obtenidos a partir de biopsias cardíacas humanas, también sustentan un papel activador de la CaMKII sobre el RyR2. En pacientes con miocardiopatía dilatada no isquémica, aumenta la fosforilación del sitio S2815. Lo mismo ocurre en los ratones sometidos a sobrecarga hemodinámica por constricción de la aorta transversa (CAT) sugiriendo que la fosforilación del sitio S2815 participa en la pérdida espontánea de  $Ca^{2+}$  en diástole y en el desarrollo de insuficiencia cardíaca de origen no-isquémico [Respress JL, 2012]. Cuando los experimentos de CAT fueron realizados en ratones S2814A se observó una menor frecuencia de chispas semejante a la disminución observada bloqueando farmacológicamente la CaMKII. Resultados similares se obtuvieron en ratones que presentaban ablación de la CaMKII, cuando fueron sometidos a CAT [Ling H, 2009].

La seudofosforilación constitutiva del RyR2 por sustitución de la Serina por un Acido glutámico en la posición 2814 (S2814D), no produce grandes

alteraciones en condiciones basales, aunque los animales desarrollan miocardiopatía dilatada aproximadamente al año [van Oort RJ, 2010]. Estos ratones presentan una mayor incidencia de chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y una reducción esperable de la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, sin embargo mantienen una contractilidad similar a los ratones controles gracias a una mayor liberación fraccional de  $\text{Ca}^{2+}$  que les permite alcanzar un transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  normal en cada latido [van Oort RJ, 2010].

En base a las evidencias presentadas y a modo de resumen, podemos concluir que la fosforilación del residuo S2814 por CaMKII aumenta la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el RyR2, existiendo, en principio, un consenso significativo entre los grupos de investigación respecto a su función.

El sitio S2030 (o 2031 según la especie), dependiente de PKA, es el más recientemente descrito. A diferencia del sitio S2808, éste presenta un bajo nivel de fosforilación basal. El aumento de su fosforilación incrementaría la sensibilidad del RyR2 al  $\text{Ca}^{2+}$  luminal [Xiao B, 2006]. Sin embargo, algunos trabajos no han podido demostrar un efecto funcional medible de tal modificación. Será necesario un mayor número de estudios para determinar su significado fisiológico *in-vivo*.

Los mecanismos activados o inhibidos por las fosforilación descriptas finalizan por acción de distintas fosfatasas. Se acepta actualmente que la fosfatasa PP1 desfosforila los residuos S2808 y S2814, mientras que la PP2A sólo actúa sobre el S2814 [Huke S, 2008]. Ambas enzimas están formando parte del “mega complejo” que constituye el canal de RyR2 (**Figura 12**).

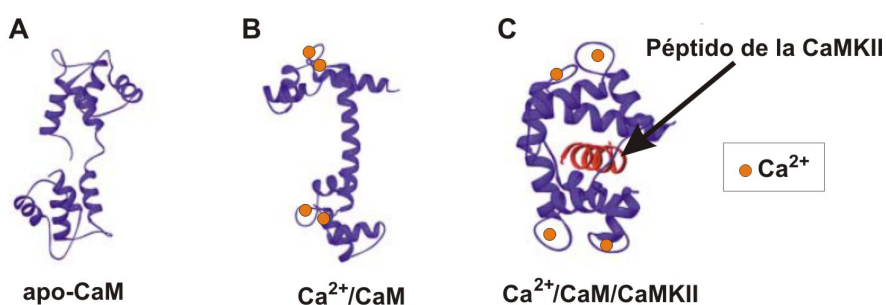
## CALMODULINA

La Calmodulina (CaM, del inglés Calcium modulatory protein) es una proteína con alta afinidad y especificidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  que se activa en respuesta a incrementos intracelulares de este ión, regulando la actividad de numerosos sustratos, entre ellos la CaMKII [Clapham DE, 2007].

La CaM es una proteína que se expresa en forma ubicua en todas las células eucariotas. Posee una estructura semejante a una mancuerna, con dos

dominios globulares en los extremos (**Figura 14**). Cada uno de los dominios cuenta con dos sitios de unión para el  $\text{Ca}^{2+}$  [Vetter SW, 2003].

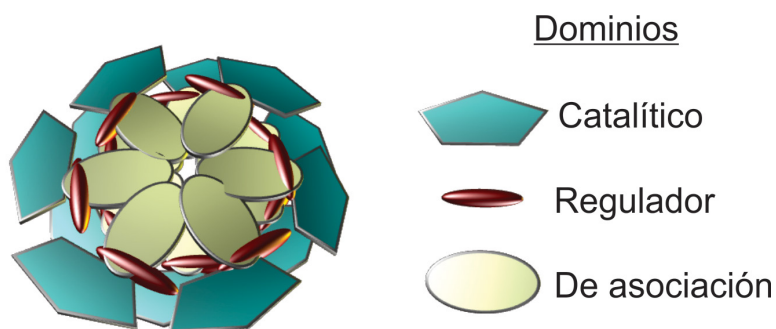
La gran flexibilidad de la que se encuentra dotada la región central de unión, permite a CaM unirse a más de 300 proteínas [Yamniuk AP, 2004].



**Figura 14. Estructura de la CaM.** (A) En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , (B) tras la unión a este ión y (C) luego de la interacción con CaMKII.

## PROPIEDADES Y FUNCIONES DE LA CaMKII

Como se desprende de lo dicho anteriormente, el  $\text{Ca}^{2+}$  constituye un importante segundo mensajero en el contexto de la fisiología y fisiopatología cardiovascular. El aumento de su concentración intracelular determina,



**Figura 15. Esquema tridimensional que muestra la estructura de la CaMKII en su conformación inactiva (cerrada).**

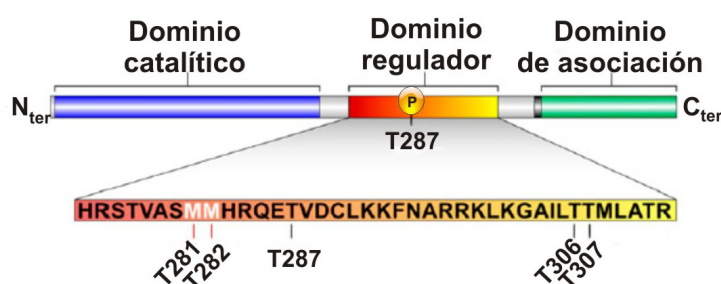
entre otros efectos, la activación de una familia de quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM (CaMKs) que incluye al menos 81 proteínas del proteoma humano [Manning G, 2002]. Tres de ellas son las quinasas multifuncionales: CaMKI, CaMKII, y CaMKIV.

Las CaMKs son enzimas que catalizan la fosforilación de otras proteínas en residuos de serina y treonina. Por medio de este mecanismo de regulación reversible participan de diversos aspectos de la señalización celular: la liberación

de neurotransmisores, el AEC del músculo, el metabolismo y la expresión génica [Tokumitsu H, 1999].

En el corazón se han detectado la CaMKI y la CaMKII. La CaMKI es monomérica, se encuentra en el citoplasma y su rol en miocardio aún no ha sido dilucidado [Uemura A, 1998; Colomer JM, 2003]. La CaMKII fue la primera descrita entre aquellas cuya actividad depende del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM [Schulman H, 1978]. Es una proteína multimérica (homo- o heteromultimérica) constituida por 6 a 12 subunidades, siendo esta última conformación la más frecuentemente observada en condiciones fisiológicas [Hoelz A, 2003]. El dodecámero se organiza en dos anillos hexaméricos que se apilan uno encima del otro [Gaertner TR, 2004] (Figura 15).

Cada subunidad posee un peso cercano a 50 kDa y aproximadamente 480 aminoácidos pudiéndose reconocer en ellas 3 dominios: un dominio de asociación en el extremo  $\text{C}_{\text{ter}}$ , un dominio catalítico, serina/treonina quinasa que corresponde al



**Figura 16. Esquema de la estructura de una subunidad de la CaMKII.** Se muestra los 3 dominios constituyentes del monómero, ampliándose la región regulatoria para resaltar los residuos aminoacídicos implicados en la modulación de la actividad de esta quinasa (T287, T306 y T307; M281 y M282). Modificado de Erickson JR, 2008.

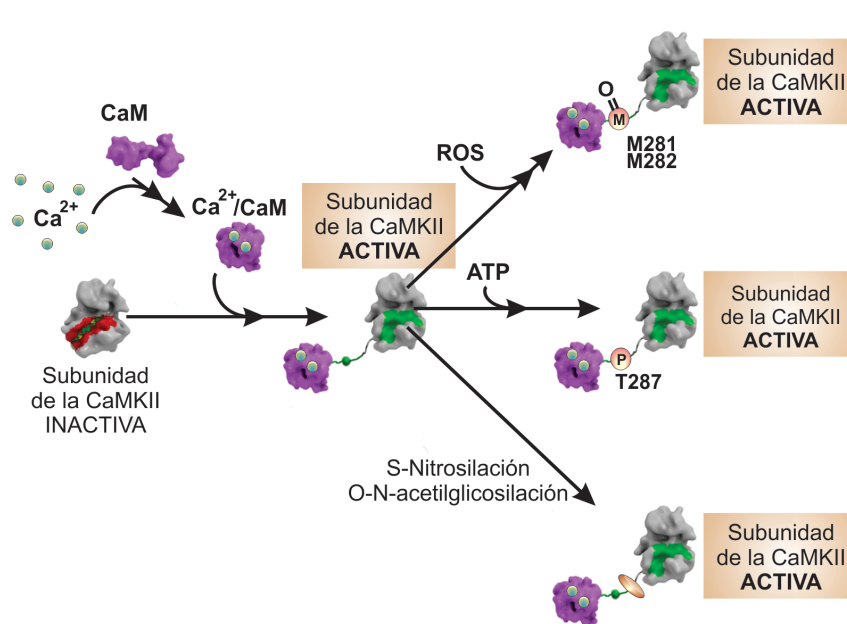
extremo  $\text{N}_{\text{ter}}$  y un dominio regulador (Figura 16). Entre este último y el dominio  $\text{C}_{\text{ter}}$  de asociación se encuentra una región conectora de longitud variable (específica según la isoforma). La longitud de esta región es importante debido a que cuanto más extensa es, mejor accede a ella el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM [Chao LH, 2010]. Este hecho podría explicar la diferente sensibilidad de las isoformas a iguales concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares [De Koninck P, 1998].

Los monómeros constituyentes se encuentran relacionados entre sí a través del dominio  $\text{C}_{\text{ter}}$  de asociación, dando lugar al auto ensamblaje incluso en ausencia de los otros dominios de la enzima [Hoelz A, 2003]. Este dominio podría además participar en la interacción con otras proteínas [Hoch B, 1999].

El multímero puede estar constituido por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\gamma$  codificadas cada una por distintos genes [Braun AP, 1995; Kanaseki T, 1991]. De las 4 subunidades mencionadas, la  $\alpha$  y la  $\beta$  son de localización preferentemente nerviosa mientras que las demás se encuentran ampliamente distribuidas en múltiples tejidos [Tobimatsu T, 1989]. Algunas de ellas presentan variantes de corte y empalme alternativos (splicing) y varias de ellas, como la  $\delta$ B contienen señales que las dirigen al núcleo. En el corazón ha sido demostrada por Northern blot la presencia de subunidades  $\delta$  y  $\gamma$  [Tobimatsu T, 1989]. La subunidad  $\gamma$  se encuentra en escasa cuantía, siendo la isoforma  $\delta$  la predominante en mamíferos incluido el humano [Hoch B, 1999; Maier LS, 2002]. La isoforma  $\delta$  presenta dos variantes principales de splicing reconocidas hasta la fecha: la  $\delta_B$  que modula la expresión de genes pro-hipertróficos y la señalización nuclear de  $\text{Ca}^{2+}$  [Mishra S, 2011] y la  $\delta_C$ , asociada con la fosforilación de proteínas involucradas en el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a nivel del RS como PLN y RyR2. En condiciones basales, en ausencia del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, el dominio catalítico se encuentra inactivo por su unión al dominio regulatorio (auto-inhibición) En este último se halla presente un aminoácido importante en el funcionamiento de la CaMKII, el residuo Treonina 287 (T287). La unión del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM al dominio regulatorio, determina un cambio conformacional que interrumpe la interacción auto-inhibitoria, permitiendo que el sitio catalítico se despliegue dejando libre los sitios de unión para el ATP y el sustrato. La subunidad ahora activa, puede auto-fosforilar el residuo T287 antes mencionado (**Figura 17**). Esta fosforilación tiene dos consecuencias fundamentales: en primer lugar, aumenta unas 1000 veces la afinidad por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM [Meyer T, 1992] debido a un cambio conformacional que estabiliza la interacción entre la CaMKII y la CaM, [Anderson ME, 2007]. En segundo lugar, aunque el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM se disocie al descender los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , la enzima se mantiene activa (en un 20-50%) por auto- fosforilación [Griffith LC, 2004].



La disociación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM permite la auto-fosforilación de sitios adicionales dentro del dominio regulador: los residuos T306 y T307. Estas fosforilaciones impiden que vuelva a unirse el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM en un proceso denominado “sellado” que limita la activación máxima persistente de esta



**Figura 17. Mecanismos de activación propuestos para CaMKII.** Con fines explicativos se muestran los posibles mecanismos de activación de una única subunidad de la CaMKII. La forma de activación clásica por medio de la unión del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina y las modificaciones post-traduccionales que permiten a la enzima mantenerse activa en ausencia de niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$ : la fosforilación de T287 (ATP), la oxidación (M281, M282), la O-GlcNAc (S280) y la S-nitrosilación (sitio aún no identificado). (Modificado de Rellos P, 2010 y Erickson JR, 2014).

quinasa [Hudmon A, 2002]. A su vez la actividad de la enzima se ve limitada cuando el fosfato en T287 es removido por acción de fosfatasa tales como PP1, PP2A, PP2C y la CaMKP, proteína fosfatasa con especificidad para la familia de CaMK, [Ishida A, 2003].

Las formas descritas de activación a través del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM y la auto-fosforilación del residuo T287 se conocen hace más de dos décadas, sin embargo, en los últimos años, nuevos modos de regulación de la actividad de CaMKII por modificaciones post-traduccionales han sido identificados.

En primer lugar la CaMKII podría mantenerse activa en forma autónoma (aún tras la disociación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM) por modificaciones producidas por incremento en las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species). Los ROS oxidan los aminoácidos metionina en posición 281 y 282 (para la CaMKII $\delta$ ) ubicados en el dominio regulador y muy próximos al sitio de fosforilación T287 [Erickson JR, 2008]. El análisis cristalográfico de la proteína sugiere que la oxidación de la metionina en posición 282 mantiene activa a la CaMKII impidiendo la re-asociación entre los dominio catalítico y regulador [Rellos

P, 2010]. La metionina sulfóxido reductasa A (MsrA) es la enzima responsable de reducir los residuos de metionina oxidados, lo cual permite dar fin a la señalización persistente de CaMKII inducida por ROS [Erickson JR, 2008].

Hallazgos más recientes, describen otro potencial mecanismo para la activación de CaMKII. Las evidencias sugieren que el óxido nítrico (ON) podría mediar la S-nitrosilación de la quinasa en residuos cisteína del dominio regulatorio [Gutierrez DA, 2013]. Sin embargo aún son controvertidas las consecuencias de dicha modificación sobre la actividad de la enzima [Erickson JR, 2014].

Se ha descrito que, en condiciones de hiperglucemia, la O-N-acetilglicosilación (O-GlcNAc) del residuo S280 catalizada por la enzima O-GlcNAc-transferasa, conduce a la activación persistente de esta quinasa [Erickson JR, 2014]. Este modo de activación no canónica de la CaMKII cobraría relevancia en el contexto de la diabetes. La O-GlcNAc de CaMKII podría desempeñar un papel crítico en el remodelamiento estructural y eléctrico del corazón del paciente diabético. Todos los mecanismos de activación mencionados se han resumido en la **Figura 17**.

## EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

El corazón de un adulto sano posee un tamaño relativamente pequeño ( $\approx 300$  gr), a pesar de lo cual requiere para su funcionamiento normal unos 30 Kg. de ATP [Ferrari R, 2003], de los 50 Kg totales que se producen a diario [Kühlbrandt W, 2015]. Debido a su gran demanda energética el corazón depende críticamente del constante aporte de nutrientes y oxígeno.

Cuando una arteria coronaria se obstruye, el territorio miocárdico cuyo riego dependía de la misma se encuentra en peligro constituyendo lo que conocemos como área en riesgo (AAR, del inglés area at risk). Si la duración del período isquémico es breve y no supera los 15-20 minutos se logra prevenir la muerte celular en forma completa [Braunwald E, 1982; Buja LM, 2013]. Por el contrario si el tiempo de isquemia se prolonga la totalidad del AAR se transformará en tejido

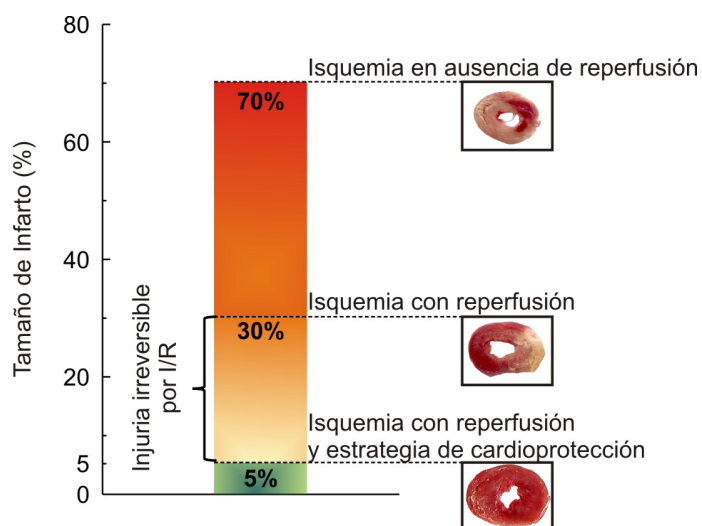
necrótico dando lugar a un infarto de miocardio establecido. La base de la patología derivada del infarto agudo de miocardio (IAM) es la muerte de los cardiomiocitos [Ruiz Meana M, 2009]. El tamaño final del infarto determinará el grado de remodelado adverso del ventrículo izquierdo, la posible progresión a insuficiencia cardíaca y consecuentemente el pronóstico del paciente [Heusch G, 2014].

Cuando la obstrucción coronaria es diagnosticada en un paciente, difícilmente la reperfusión del tejido se instaure antes de haber ocurrido muerte celular. Grandes ensayos clínicos han demostrado que la reperfusión a través de la terapia trombolítica precoz luego del IAM, se asocia con una mejor función ventricular y mayor sobrevida [Hasche ET, 1995]. En respuesta a la restauración del flujo habrá células que son capaces de recuperar el control de la homeostasis y sobrevivir, mientras que otras no logran corregir el desequilibrio, sino que lo empeoran y mueren. Con el término *injuria por reperfusión* se hace referencia a los efectos deletéreos que se encuentran ligados a la reperfusión, que no fueron productos del período de isquemia anterior y que pueden ser revertidos por una intervención aplicada en el

momento de la reperfusión [Piper HM, 1998]. Clásicamente se incluyen dentro de la injuria por reperfusión: la disfunción mecánica del ventrículo izquierdo, las arritmias de reperfusión y la muerte celular [Braunwald E, 1982; Valverde C.A., 2006; Said M, 2011].

Se estima que la injuria por reperfusión es responsable de aproximadamente el 50% de la superficie final del infarto [Yetgin T, 2010], hecho por el cual Braunwald

E. hace referencia a la misma como una “espada de doble filo” [Braunwald E,



**Figura 18. Gráfico que muestra la reducción en el tamaño del infarto logrado por la reperfusión sin y con estrategias de cardioprotección tras un episodio de isquemia prolongado.** El miocardio infartado se evidencia por el color rosa/blanco, mientras que el miocardio viable se tiñe de color rojo. El tamaño del infarto se expresa como porcentaje de la superficie total. (Modificado de Yellon DM, 2007).

1985] (**Figura 18**). La pérdida de células irreversiblemente dañadas como consecuencia de ambos eventos, isquemia y reperfusión es lo que se conoce como *injuria irreversible* por I/R.

Los siguientes son los mecanismos descriptos que conducen a la muerte del miocito cardíaco como consecuencia de la I/R.

#### **a) Sobrecarga de $\text{Ca}^{2+}$**

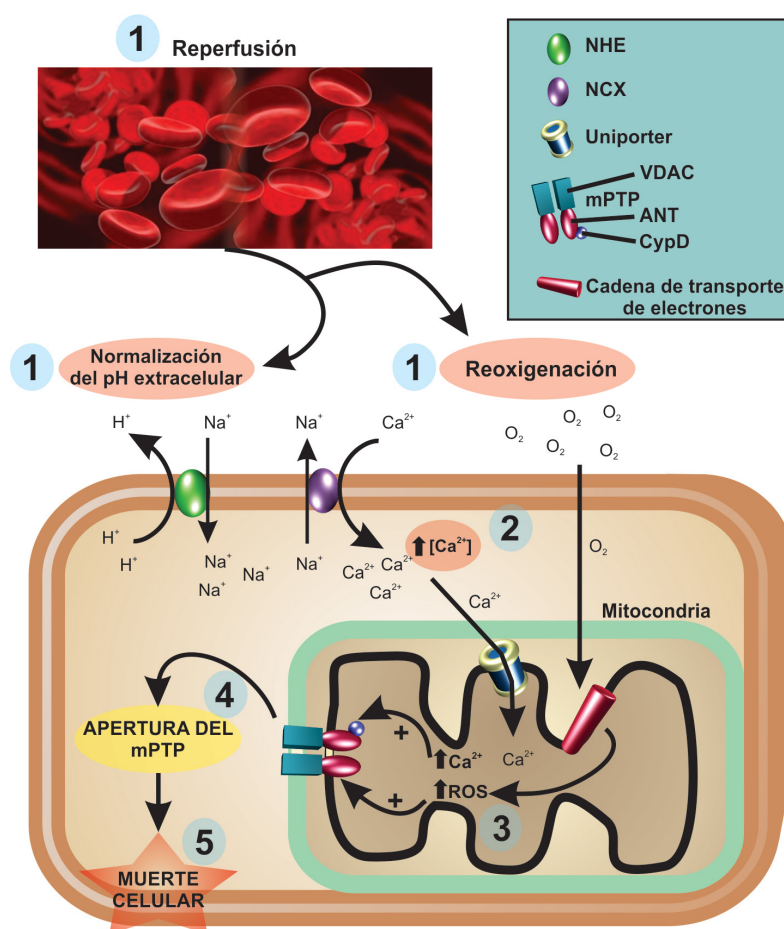
Como detallamos previamente, la interrupción en el flujo sanguíneo conduce al cese de la fosforilación oxidativa por falta de oxígeno, causando disminución de ATP y fosfato de creatina. Consecuentemente, se activa la glucólisis anaeróbica, en un intento por satisfacer la demanda energética pero ésta es incapaz de producir el nivel requerido de ATP. Este hecho se combina con la disminución del pH intracelular e intersticial producto de la acumulación de ácido láctico generado por la vía glucolítica [Kalogeris T, 2012]. En el corazón aislado de rata, al producirse la isquemia, el pH intracelular que normalmente es de 7.2, comienza a declinar alcanzando a los 20 minutos, valores cercanos a 6.4 [Hendrikx M, 1994].

La reperfusión restaura rápidamente el pH intersticial induciendo la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) que, al expulsar los protones en un intercambio con  $\text{Na}^+$  incrementa la concentración intracelular de este ión. En este contexto el aumento de  $[\text{Na}^+]_i$  puede agravarse debido a la alteración estructural de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa por oxidación o degradación proteolítica afectando el funcionamiento de la bomba [Garcia-Dorado D, 2012]. El aumento de  $[\text{Na}^+]_i$  induce la despolarización de la membrana y la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) en su modo reverso provocando un ingreso neto de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la reperfusión que puede contribuir directa o indirectamente a la muerte celular (**Figura 19**). El aumento de  $[\text{Na}^+]_i$  intracelular determina también, el hinchamiento celular y este estrés osmótico puede contribuir a la muerte del miocito predisponiendo a la ruptura del sarcolema.

Durante la isquemia se puede observar una contractura debida al ciclado lento de los puentes cruzados de actina-miosina, por la presencia de bajos niveles de ATP citosólico (menores a 100  $\mu\text{M}$ ) [Nichols CG, 1990]. Dicha contracción tiene una intensidad moderada y no causa en principio daño estructural. Por el contrario la reperfusión ejerce efectos drásticos sobre la maquinaria contráctil del miocito (hipercontractura), provocando un marcado acortamiento miofibrilar y

daño del citoesqueleto. Esto se traduce funcionalmente en un aumento de la presión diastólica final y rigidez parietal producto del simultáneo incremento en la producción de ATP y los altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular [Piper HM, 2004]. Las fuerzas mecánicas que resultan de la hipercontractura de las células adyacentes producen la ruptura de la membrana celular y conducen a la necrosis [Piper HM, 1998]. El uso experimental de 2,3-butanediona monoxima (BDM), un inhibidor de la actividad de la miosina, en los corazones sometidos a I/R reduce el tamaño del infarto y la liberación de la enzima intracelular láctico-deshidrogenasa [García-Dorado D, 1992].

Otra consecuencia de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es la activación de una familia de tiol proteasas no lisosomales dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  llamadas



**Figura 19. Eventos celulares que conducen a la apertura del mPTP durante la reperfusión.** Se esquematizan los siguientes sucesos: (1) Reperfusión con restablecimiento del pH extracelular y reoxigenación, (2) Sobrecarga citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , (3) Incremento de los ROS y del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (4) Apertura del mPTP (5) Muerte celular (Modificado de Walters AM, 2012).

calpaínas [Inserte J, 2012]. Varias son las alteraciones que la activación de estas enzimas produce en la I/R. En primer lugar, clivan componentes del citoesqueleto como la  $\alpha$ -fodrina y la ankirina, conduciendo a un aumento de la fragilidad de la membrana plasmática y por lo tanto a una reducción en la tolerancia a la hipercontractura celular y al estrés osmótico [Inserte J, 2004]. Además la proteólisis de otros componentes celulares como la Troponina C, la Troponina I y la desmina contribuyen a la disfunción contráctil característica de la reperfusión. Múltiples dianas adicionales han sido descritas como blancos de las calpaínas activadas por la I/R [Inserte J, 2012].

Parte del exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico puede ser internalizado por las mitocondrias a través del uniporter mitocondrial, permitiendo la llegada de estas iones a la matriz mitocondrial, donde contribuyen a la apertura del llamado poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP, en inglés) (**Figura 19**). En la formación de este poro participan principalmente tres proteínas: el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) en la MME, la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT) en la MMI y la ciclofilina (CypD) en la matriz [Baines CP, 2009]. El mPTP es un canal de elevada conductancia, que une directamente el citoplasma con la matriz mitocondrial permitiendo el pasaje libre de iones, agua y moléculas de hasta 1,5 kDa [Zoratti M, 1995].

La apertura del mPTP determina el colapso del gradiente de protones lo que conduce a un desacople de la fosforilación oxidativa y al bloqueo de la síntesis de ATP, comprometiendo la supervivencia de los cardiomiocitos. La gran cantidad de solutos presentes en la mitocondria provoca el influjo de agua hacia la matriz y la consecuente edematización de la misma que, al sobrepasar la escasa capacidad de estiramiento de la MME, lleva finalmente a la rotura mitocondrial [Gustafsson AB, 2008]. Si bien la ruptura mitocondrial puede determinar la liberación del citocromo c y otras proteínas pro-apoptóticas en el citosol, se cree que la apertura del mPTP conduce a la muerte celular, principalmente por necrosis [Halestrap AP, 2006; Walters AM, 2012].



## b) Aumento en la producción de ROS/RNS

Aunque en condiciones normales, pequeños niveles de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) son generados por las células, el restablecimiento del flujo sanguíneo al tejido isquémico no sólo permite la reanudación de la fosforilación oxidativa y la producción de ATP, sino que también da lugar a un aumento en la generación de ROS y especies reactivas del N<sub>2</sub> (RNS). Estas moléculas son capaces de interactuar con constituyentes celulares tales como lípidos de membrana, proteínas y ADN, dañándolos [Mozaffari MS, 2013]. Este fenómeno ha sido denominado la “paradoja del oxígeno” [Hearse DJ, 1973].

En el corazón aislado y perfundido de rata sometido a una isquemia global de 40 min se demostró un incremento de más de 4 veces en la generación de  $O_2^{\bullet-}$  al principio de la reperfusión [Koyama T, 2013]. Durante la I/R: existen múltiples fuentes potenciales de ROS: la actividad del citocromo P450, el desacople y daño de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la xantina oxidasa, la NAD(P)H oxidasa y la actividad de las óxido nítrico sintasas desacopladas [Kalogeris T, 2012]. Entre los diferentes tipos de ROS, el papel deletéreo del  $O_2^{\bullet-}$  ha sido claramente demostrado al evidenciarse una disminución del daño en ratones sometidos a I/R que sobreexpresan la superóxido dismutasa (SOD) [Horie Y, 2001]

Debido a que el  $O_2^{\bullet-}$  tiene una vida media extremadamente corta sólo sería capaz de afectar a aquellos componentes celulares que se encuentran muy próximos al sitio de producción. Por el contrario, el  $H_2O_2$  es menos reactivo pero puede cruzar membranas y actuar como segundo mensajero [Bretón-Romero R, 2014] formando además otras especies altamente reactivas como el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) [Fenton JHJ, 1894].

Las RNS, derivan del óxido nítrico (ON) y también desempeñan un papel en la injuria por I/R. De hecho la interacción entre ROS y RNS puede extender la lesión a través de la formación de nuevas especies con gran poder pro-oxidante como el peroxinitrito [Kalogeris T, 2012]. Este mecanismo puede llevar a la disminución de la biodisponibilidad de ON, el cual, en bajos niveles, tiene función señalizadora y cardioprotectora [Pacher P, 2007; Lima B, 2010].

### c) Muerte celular

En el corazón, producto de la incapacidad de una replicación celular compensadora significativa, la muerte celular se convierte en el eje central que subyace a gran parte de la fisiopatología cardiovascular.

La descripción de la muerte celular adolece de un serio problema y es que la comunidad científica todavía no ha adoptado un sistema de clasificación que esté basado más en los parámetros bioquímicos que en el aspecto morfológico. En el presente trabajo se utilizará la terminología y lineamientos establecidos por el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular [Galluzzi L, 2012].

Tres formas principales de muerte celular han sido clásicamente descritas en la injuria por I/R miocárdica: la necrosis, la apoptosis y la autofagia [McCully JD, 2004] (Figura 20 y 22). Sin embargo, actualmente se han descrito al menos 13 tipos diferentes de muerte celular (catástrofe mitótica, anoikis, entosis, pyroptosis, necroptosis, etc) [Galluzzi L, 2012].

#### c.i) Necrosis

Las características fundamentales de la necrosis desde el punto de vista morfológico incluyen: la edematización de las células y sus organelas, la

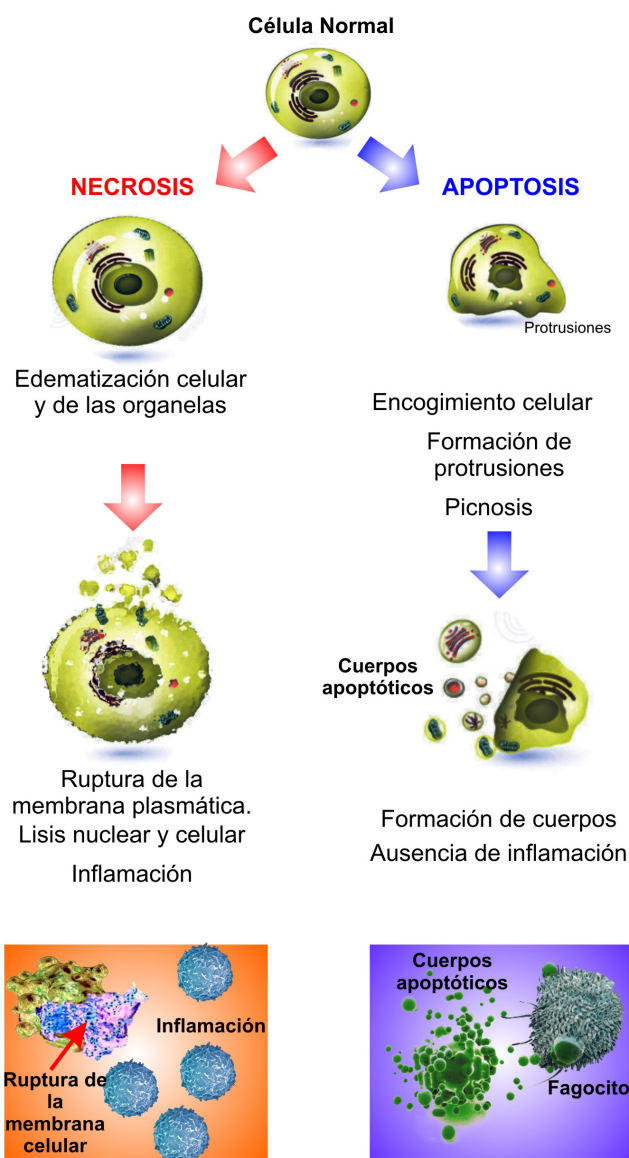


Figura 20. Principales mecanismos de muerte celular en la injuria por I/R miocárdica y sus características más relevantes.

disociación de los ribosomas del RE rugoso, la pérdida de la integridad estructural de la membrana plasmática, y tardíamente desintegración y condensación nuclear de la cromatina. La ruptura de la membrana plasmática conduce a la liberación masiva del contenido de la célula al espacio intersticial lo que genera una respuesta inflamatoria secundaria [Ziegler U, 2004]. Es de destacar que esta liberación del contenido celular tiene valor diagnóstico en la práctica clínica y es un marcador de la presencia de necrosis miocárdica. El grado de necrosis puede evaluarse a través de la medición de enzimas liberadas como la lacticodeshidrogenasa (LDH), la creatinfosfoquinasa (CK) y sus isoenzimas y proteínas no enzimáticas como las troponinas cardíacas [Dos Santos A, 1999; Bel MS, 2003].

Dadas sus características morfológicas, clásicamente la necrosis se ha considerado un proceso de muerte pasivo, accidental y no regulado, consecuencia directa de un estrés abrumador para la célula. Por lo tanto se creyó que no podía ejercerse ningún control sobre ella. [Kalogeris T, 2012, Kung G, 2011]. Sin embargo, en la última década distintas líneas de investigación han puesto en evidencia que este tipo de muerte es un proceso que también puede ser regulado [Whelan RS, 2010, Jouan-Lanhouet S, 2014] y esta forma de “necrosis programada” ha recibido el nombre de Necroptosis [Degterev A, 2005]. Esta vía se inicia con la activación de receptores por parte de serina/treonina quinasas denominadas “proteínas que interactúan con el receptor” (del inglés, receptor interacting proteins, RIPs) [Smith CC, 2011], aumentando la producción de ROS los cuales contribuyen a la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP) dañando irreversiblemente las mitocondrias. [Morgan MJ, 2008, Vandenabeele P, 2010, Marshall KD, 2014].

Actualmente no se conoce la contribución relativa de la forma no regulada frente a la necrosis programada, pero esta última ha sido demostrada en el infarto de miocardio y otras entidades como la insuficiencia cardíaca y el accidente cerebrovascular [Whelan RS, 2010].

### c.ii) Apoptosis

Los hallazgos morfológicos más característicos de la apoptosis son la condensación de la cromatina (picnosis) y la fragmentación nuclear en las fases más tardías (cariorrexis). Los cambios nucleares se acompañan de una degradación internucleosomal del material genético, generando fragmentos de ADN de doble cadena de 180 a 200 pares de bases. Las células apoptóticas presentan encogimiento celular con pérdida del contacto con sus vecinas y aparición de protrusiones en la superficie de la membrana plasmática denominadas vesículas o ampollas. La membrana plasmática y organoides celulares incluyendo las mitocondrias, se preservan, al menos, durante las fases iniciales. Finalmente las vesículas se desprenden de la superficie celular llevándose consigo parte del citoplasma, organelas y/o fragmentos nucleares dando origen a los cuerpos apoptóticos, que serán capturados por fagocitos o células vecinas. Como los componentes celulares no escapan de la célula, no se produce respuesta inflamatoria. Sin embargo, si los cuerpos apoptóticos no son fagocitados, sufren cambios similares a la necrosis, con liberación de su contenido al exterior, lo que ha sido llamado "necrosis secundaria" [Ziegler U, 2004; Kroemer G, 2008].

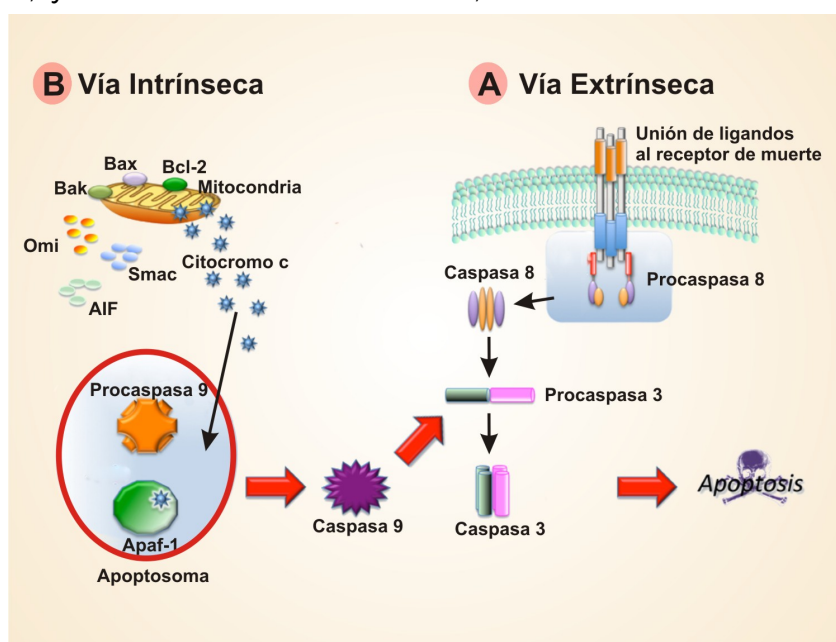
En la producción de apoptosis han sido descritas principalmente dos vías de señalización: una vía extrínseca (también conocida como "vía del receptor de muerte"), en la que la apoptosis se desencadena por la activación inducida por un ligando (Fas, TNF, etc.) interactuando con el llamado "receptor de muerte" en la superficie celular; y una vía intrínseca (también llamada "vía mitocondrial"), resultante de una cascada intracelular de eventos entre los cuales se destaca la permeabilización de la MME que determina la salida al citosol de una serie de componentes pro-apoptóticos que normalmente se encuentran confinados al espacio intermembrana [Crow MT, 2004; Kalogeris T, 2012]. Las proteínas liberadas incluyen entre otras al citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, y la endonucleasa-G (EndoG). La permeabilidad de la mitocondria se encuentra estrechamente regulada por una familia de proteínas denominada Bcl-2, dentro

de la cual están incluidos miembros antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-xL y proapoptóticos: Bax, Bak, Bad, Bim, Bik, Blk, Puma y Noxa [Broughton BR, 2009].

Bax y Bak son necesarios para iniciar la activación de la vía intrínseca, ya que los animales deficientes en estas proteínas son resistentes a la apoptosis por ese mecanismo [Wei MC, 2001]. A través de un proceso no totalmente establecido los estímulos apoptóticos activan Bax y Bak. La activación de Bax conlleva su translocación desde el citosol a la mitocondria, y su inserción en la MME, facilitando la salida del citocromo c entre otros componentes [Suzuki M, 2000]. En el caso de Bak, ya está anclado en la MME, interaccionando con la

proteína llamada VDAC 2 (del inglés, voltage-dependent anion channel 2), integrante del mPTP que lo mantiene inactivo. Esta inhibición desaparece al activarse otras proteínas como Bim, Bad y Bid las cuales separan al VDAC2,

permitiendo la oligomerización de Bak en la MME y la consecuente liberación de componentes proapoptóticos [Crow MT, 2004] (Figura 21).



**Figura 21. Las vías de la apoptosis.** La vía extrínseca (A) comienza con la activación de un receptor de muerte en la superficie celular que conduce a la activación de la caspasa-8. Posteriormente, la activación de la caspasa efectora 3, inicia la proteólisis de estructuras vitales como el citoesqueleto y organelas conduciendo a la célula a la muerte celular apoptótica. En (B) se muestra la vía intrínseca, que es desencadenada por un estrés mitocondrial. La permeabilización de la MME libera factores pro apoptóticos como Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 y el citocromo c. Finalmente se da lugar a la formación del apoptosoma, que activa a la caspasa 9, la cual a su vez es capaz de clivar y activar a la caspasa 3. Membrana mitocondrial externa, MME.

En cuanto a los principales miembros antiapoptóticos, Bcl-2 se encuentra constitutivamente en la MME, el RS y la envoltura nuclear [Krajewski S, 1993]. Se acepta que la relación Bcl-2 o Bcl-xL / Bax o Bak es determinante para que la célula inicie o no la cascada apoptótica [Oltvai ZN, 1993].

Las dos vías de apoptosis requieren de la activación posterior de un grupo de enzimas denominadas caspasas, que se encuentran normalmente en la célula como zimógenos inactivos (procaspasas). Las caspasas se pueden dividir en dos subgrupos en función de su estructura y de la secuencia temporal de activación durante la muerte celular [Fink SL, 2005]: las caspasas iniciadoras 2, 8, 9 y 10 que activan a su vez al otro grupo de caspasas, las efectoras 3, 6, y 7.

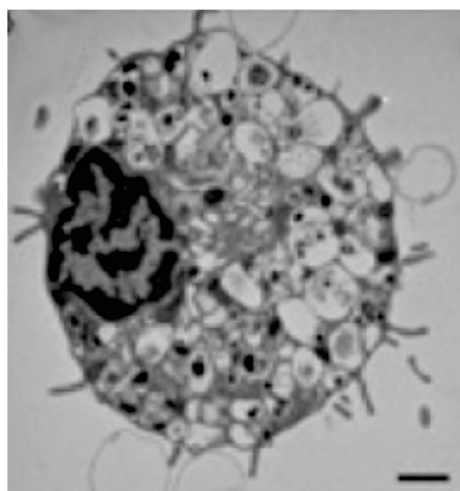
Para activar las caspasas el citocromo c liberado al citoplasma, interacciona con una proteína denominada APAF-1 (del inglés, apoptotic protease activating factor-1) que al unirlo se oligomeriza y recluta a la procaspasa-9 para dar lugar a la formación de una estructura denominada apoptosoma [Jiang X, 2000; Acehan D, 2002] con la consecuente activación de la caspasa-9. Una vez activada, la caspasa-9 cliva a la procaspasa-3 [Slee EA, 1999]. La caspasa 3 es la encargada de llevar a su fin el programa de muerte celular a través de la escisión de al menos 45 proteínas diferentes: proteínas citoplasmáticas, del citoesqueleto y de unión celular, nucleares, del metabolismo, de reparación del DNA, quinasas, involucradas en la señalización celular, proteínas reguladoras del ciclo celular, y proteínas de la propia apoptosis (Bcl-2 y Bcl-xL,) [Earnshaw WC, 1999].

Un segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas son liberadas por la mitocondria permeabilizada: AIF (del inglés, Apoptosis-inducing factor), la endonucleasa G y la CAD (del inglés, Caspase-Activated DNase) que necesita ser activada por la caspasa 3. Todas ellas se translocan al núcleo causando la fragmentación del ADN en segmentos de 50-300 kb [Joza N, 2001] y la condensación de la cromatina característica de la apoptosis [Elmore S, 2007]. Normalmente las células se encuentran protegidas de la apoptosis por medio de un grupo de proteínas denominadas “inhibidores de la apoptosis” que incluyen a XIAP (del inglés, X-linked inhibitor of apoptosis) y a cIAP 1 y 2 (del inglés, cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2) capaces de inhibir a la caspasa 3, 7 y 9 [Deveraux QL, 1998].

### c.iii) Autofagia

La “muerte celular autofágica” se define morfológicamente como la muerte que se produce en ausencia de condensación de la cromatina, pero acompañada por vacuolización autofágica masiva del citoplasma (**Figura 22**) [Galluzzi L, 2012].

La autofagia es un proceso fisiológico por el cual la célula a través de la formación de un “autofagosoma” secuestra componentes citoplasmáticos



**Figura 22. Microscopía electrónica de una célula que presenta muerte celular autofágica** (Barra = 1  $\mu\text{m}$ ). (Tomado de Nikolettou V, 2013)

dañados o en exceso para su eliminación [Gustafsson AG, 2008]. La autofagia proporciona a la célula una herramienta para afrontar condiciones adversas, (privación de nutrientes, la hipoxia, etc.), proveyéndole de aminoácidos y ácidos grasos que le permiten mantener la homeostasis. [Kalogeris T, 2012]. La deficiencia de este mecanismo en los miocitos puede conducir al desarrollo de cardiomiopatía (enfermedad de Danon) [Gustafsson AG, 2008]. Por lo antes expuesto, la autofagia es un mecanismo de supervivencia más que de muerte celular. Sin embargo, la autofagia no controlada podría contribuir a la lesión por I/R [Kalogeris T, 2012]. Se ha descrito que este proceso tendría un rol dual siendo beneficioso en la isquemia, pero deletéreo en la reperfusión [Matsui Y, 2007]. La participación de la autofagia en la lesión por isquemia y reperfusión es actualmente objeto de investigación siendo los resultados aún contradictorios.

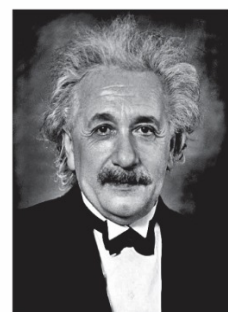


# Hipótesis y Objetivos



*«Cada día sabemos más y entendemos menos».*

**Albert Einstein (1879-1955)**



## HIPÓTESIS DE TRABAJO

Trabajos previos desarrollados en nuestro laboratorio demostraron que CaMKII desempeña un papel clave en la lesión por isquemia y reperfusión (I/R) [Vila Petroff M, 2007] y que las fosforilaciones dependientes de esta quinasa a nivel del retículo sarcoplasmático (RS) son relevantes en el mecanismo de muerte celular y disfunción contráctil que este proceso origina [Salas MA, 2010]. Considerando que CaMKII presenta dos sitios blanco a ese nivel, T17 de PLN y S2814 del RyR2, planteamos como hipótesis en este trabajo lo siguiente:

*El efecto deletéreo de la activación de CaMKII en la injuria por I/R se debe a las consecuencias funcionales de la fosforilación de su o sus sustratos a nivel del RS.*

## OBJETIVOS

### General:

- Establecer el papel desempeñado por las fosforilaciones dependientes de CaMKII a nivel del RS en el daño por I/R:

### Particulares:

En un protocolo de I/R:

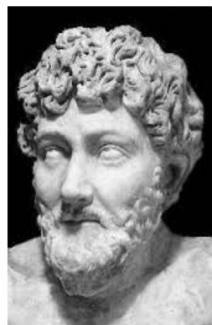
- Determinar el patrón de expresión y fosforilación de CaMKII y sus sustratos a nivel del RS: PLN y RyR2.
- Analizar a través del uso de ratones transgénicos, las consecuencias que, sobre la actividad contráctil y la viabilidad celular, produce el bloqueo simultáneo de las fosforilaciones de CaMKII a nivel del RS.
- Discriminar el rol particular que cumple en el proceso de daño miocárdico, cada una de las fosforilaciones dependientes de CaMKII en PLN y RyR2, a través de ratones con mutaciones específicas.

# Materiales y Métodos



*«Las palabras que no van seguidas de hechos, no valen nada».*

**Esopo (620 a.C. -564a.C.)**



Para estudiar las hipótesis propuestas en este trabajo de Tesis Doctoral, se combinaron medidas de parámetros mecánicos, determinaciones de viabilidad por microscopía de fluorescencia, estudios de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , caracterizaciones histológicas y determinaciones bioquímicas. Se usaron herramientas farmacológicas y ratones transgénicos para la disección de los distintos mecanismos propuestos.

Los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo con las normas de la Guía de Mantenimiento y Uso de Animales de Laboratorio (NIH, 2011). Los protocolos experimentales que se desarrollaron fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (Nro. T05022014).

## ANIMALES

Los experimentos presentados se realizaron en los siguientes ratones knock-in machos, de 3-4 meses de edad y de un peso entre 25-30 gramos:

**a) Ratones SR-AIP:** expresan un inhibidor selectivo de la actividad de CaMKII (AIP) dirigido al RS. Esta cepa fue provista por el Dr. J. Dedman con quien mantenemos una cooperación científica [Ji Y, 2003].

**b) Ratones PLNDM:** expresan una forma mutada de fosfolamban (PLN) en la que los residuos fosforilables por PKA y CaMKII, S16 y T17 respectivamente, fueron sustituidos por alanina (PLNDM) para impedir su fosforilación [Brittsan AG, 2000] (obtenidos de la Universidad de Missouri / Harlan, Mouse Regional Resource Center, NIH).

**c) Ratones Ser2814A:** expresan una forma mutada del RyR2 en la que el residuo Serina en la posición 2814 fue sustituido por alanina para impedir su fosforilación por CaMKII. Estos ratones fueron provistos por el Dr. Xander Wehrens con quien ya hemos publicado trabajos en colaboración [Chelu MG, 2009]

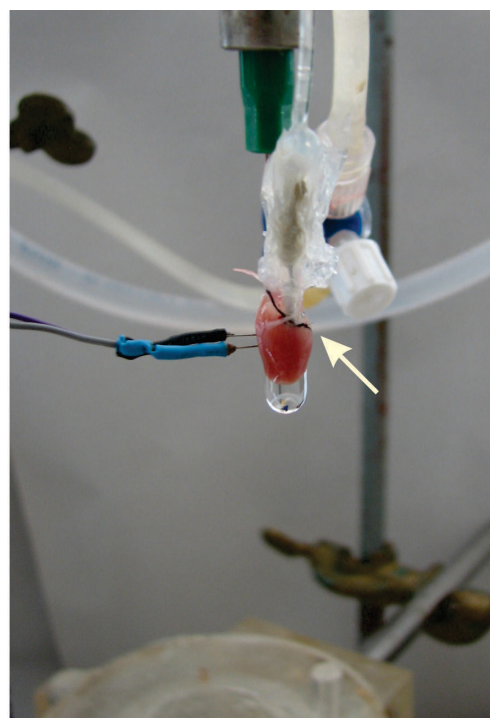
d) **Ratones Ser2814D**: expresan una forma mutada del RyR2 en la que el residuo Serina en la posición 2814 fue sustituido por ácido aspártico para imitar la fosforilación constitutiva por CaMKII. Esta cepa fue provista también por el Dr. Xander Wehrens [van Oort RJ, 2010].

Como **controles (CTL)** fueron utilizados los siguientes ratones: Wild Type (WT) de la misma cepa que los S2814A y S2814D, BALB/c para los SR-AIP y C57BL/6 para los PLNDM.

### PERFUSIÓN DE CORAZONES DE RATÓN. TÉCNICA DE LANGENDORFF.

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/kg comprobándose el arribo al plano profundo de anestesia a través de la pérdida del reflejo podal y corneal.

Una vez realizada la toracotomía, se canuló la aorta y el corazón aislado fue perfundido por la técnica de Langendorff [Liao R, 2012] a temperatura (37°C) y flujo coronario constante (3-4 ml/min) hasta alcanzar una presión de perfusión coronaria entre 80 y 100mmHg. Luego del pinzamiento del nódulo A-V, se fijó la frecuencia cardíaca en 300 latidos/min mediante electrodos punzados en el ventrículo derecho. Para perfundir, se empleó una solución tampón de bicarbonato con la siguiente composición (en mM): 128,3 ClNa; 4,7 ClK; 2,5 ClCa<sub>2</sub>; 20,2 HCO<sub>3</sub>Na; 0,4 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Na; 1,1 MgSO<sub>4</sub>; 11,1 glucosa y 0,04 EDTANa<sub>2</sub>. Esta solución se equilibró con 95% O<sub>2</sub> -5% de CO<sub>2</sub> hasta lograr un pH de 7,4.



**Figura 23. Corazón de ratón montado en un sistema de Langendorff y perfundido en forma retrógrada a través de la aorta.** La flecha indica la cánula que en su extremo tiene un balón que se introduce en el VI, para registrar los parámetros contráctiles del corazón durante todo el protocolo.

La actividad mecánica se registró digitalmente, mediante la introducción en el ventrículo izquierdo (VI) de un balón de látex conectado a un transductor de

presión (ADInstruments MLT 0380, CO, EE.UU.). El balón se llenó con solución acuosa hasta conseguir una presión diastólica final (PDFVI) de aproximadamente 5-10 mmHg. La contractilidad del VI se evaluó midiendo la presión desarrollada (PDVI).

Una vez montados en el equipo de Langendorff (**Figura 23**), los corazones fueron perfundidos y estabilizados durante 10 minutos (Pre-Isquemia, Pre-Isq) sometiéndolos a continuación, a la interrupción total del flujo coronario (isquemia global normotérmica, Isq.) durante un período de 45 minutos. En este lapso el corazón dejó de ser estimulado eléctricamente. Finalizada la isquemia, se restauró la perfusión coronaria (reperfusión, R) por 120 minutos, simultáneamente con la estimulación eléctrica (**Figura 24**).



**Figura 24. Protocolo experimental utilizado en el corazón de ratón.**

Al final de la perfusión o a distintos tiempos durante la misma y dependiendo del estudio a realizarse, los corazones fueron:

- a) Teñidos para determinar el área de infarto (tinción con TTC)
- b) Preservados en una solución de formol tamponado (pH 7) y posteriormente procesados para estudios histológicos con microscopía óptica de fluorescencia (TUNEL).
- c) Congelados en N<sub>2</sub> líquido y conservados a -80° C para realizar las determinaciones bioquímicas de expresión y fosforilación de las proteínas de interés (PLN, RyR2, Bax/Bcl-2, CaMKII).

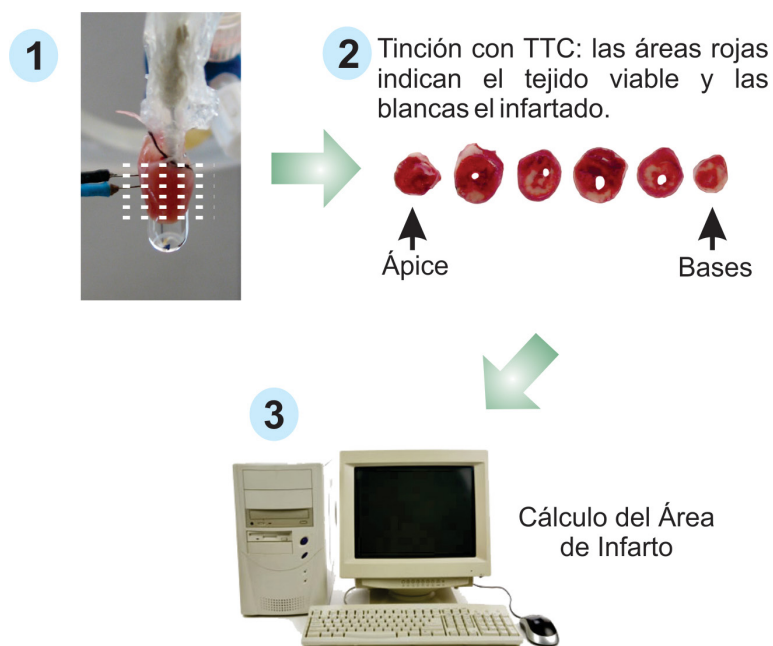
Se recolectó además el efluente de los primeros 10 min de perfusión para determinar la actividad de la enzima láctico deshidrogenasa.

Cabe señalar que la utilización de la perfusión *ex-vivo* de los corazones por medio de la técnica de Langendorff, tiene la ventaja de evitar la variabilidad del modelo *in-vivo* debida a factores tales como la influencia neurohumoral, del sistema de coagulación, inmunitario, etc. [Bernal DR, 2004].



## DETERMINACIÓN DEL ÁREA DE INFARTO

Al finalizar los 120 min de reperfusión, el corazón fue perfundido durante 7 min más, con una solución fosfato (pH 7,4) conteniendo 1% de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC). Con esta tinción, en el tejido viable el colorante es convertido por las deshidrogenasas intracelulares en un precipitado de color rojo. Por el contrario el tejido



**Figura 25. Medición del área de infarto a través de la tinción de TTC.** (1) Tinción y niveles de corte, (2) secciones de un corazón teñido con TTC y (3) digitalización y cuantificación del área de infarto.

no viable permanece de color blanco. Estando aún el corazón en el sistema de Langendorff, se lo sumergió en una cámara conteniendo la misma solución de TTC durante otros 7 min. Al finalizar la tinción, el corazón aislado del sistema de perfusión, fue mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora con el fin de dar firmeza al tejido para luego ser cortado transversalmente en seis secciones (de aproximadamente 1 mm de espesor) a lo largo del eje longitudinal del VI, desde el vértice a la base. Para visualizar mejor las áreas de infarto las secciones fueron almacenadas en solución de formaldehído al 10% durante 48 horas (**Figura 25**). Pasado este tiempo las secciones fueron escaneadas y el área de infarto calculada mediante planimetría utilizando el software ScionImage (ScionCorp, EE.UU.). El grado de infarto se expresó como porcentaje del área de riesgo, que en nuestra preparación, al ser un isquemia global, corresponde al área total del corazón [Suzuki M, 2002].

## DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LÁCTICO DESHIDROGENASA (LDH)



Para evaluar la muerte de las células miocárdicas se midió por espectrofotometría la actividad de la LDH en el efluente coronario. Esta enzima intracelular se libera en la necrosis. Se tomaron muestras a diferentes tiempos durante el protocolo: Preischemia y a 1, 5 y 10 minutos de Reperusión.



Figura 26. Espectrofotómetro Shimadzu UV-300.

La LDH cataliza la reducción del piruvato por NADH, obteniéndose lactato y NAD<sup>+</sup>. La concentración de la enzima puede ser determinada a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm de longitud de onda. En estas determinaciones se utilizó un kit comercial (Wiener lab, Germany)

Durante el procedimiento, la muestra tratada según las especificaciones del kit fue vertida en una cubeta plástica adecuada para el espectrofotómetro (Shimadzu UV 300, **Figura 26**), leyéndose la absorbancia cada 30 segundos por un período de 3 min. Con los datos obtenidos se realizó el cálculo de los resultados según las especificaciones del fabricante. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente.

## DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS

Con el fin de identificar los núcleos de las células apoptóticas se utilizó la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated X-dUTP nick end labeling). Corazones fijados e incluidos en parafina fueron cortados con un micrótopo en secciones de 5  $\mu$ m de espesor. Se procedió luego a desparafinizar e hidratar los cortes a través del pasaje por xilol (x2), alcohol 100 (x2), alcohol 96, alcohol 50 y finalmente agua destilada.

Los extremos terminales del ADN fragmentado por las caspasas, fueron detectados utilizando un kit comercial (In situ Cell Death Detection kit, Roche, Suiza). En esta reacción la deoxi-nucleotidil-transferasa fija a los extremos del ADN el nucleótido dUTP conjugado con un marcador fluorescente. Se realizó además la tinción del ADN de todos los núcleos con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Las secciones teñidas fueron capturadas con una cámara de vídeo RGB digital (Evolution VF, QImaging, Canadá) conectada a un microscopio (Olympus BX-50, Tokio). Veinte áreas de gran aumento (objetivo 40X) fueron elegidas al azar y fotografiadas analizándose aproximadamente 500 miocitos por sección. Las imágenes fueron procesadas con un programa digital analizador de imágenes (Image-Pro Plus V6.0, Silver Spring, MA) y el porcentaje de núcleos TUNEL-positivos respecto al total de núcleos fue calculado por dos investigadores independientes (estudio doble ciego). Se identificaron los miocitos cardíacos en base a sus características morfológicas (núcleos con forma elíptica y citoplasma estriado) y parámetros morfométricos [Gerdes AM, 1991].

## **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS**

Los corazones congelados a distintos tiempos de reperfusión (3, 15 y/o 120 min) fueron utilizados para evaluar la expresión de las siguientes proteínas: CaMKII, PLN, RyR2, Bax, Bcl-2 y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), siendo esta última empleada como control de carga de las proteína sembradas. Simultáneamente se estudió la fosforilación de los siguientes sitios: residuos S16 (sitio PKA) y T17 (sitio CaMKII) de PLN, residuos S2808 (sitio PKA) y S2814 (sitio CaMKII) del RyR2 y el residuo fosforilable T286 de CaMKII (p-CaMKII).

### **Preparación de homogenatos**

El tejido ventricular pulverizado de ratón resuspendido en 4 volúmenes de un medio buffer (**ver tabla I**) fue disgregado utilizando un homogenizador (Polytron, Brinkman Instruments).

Componente	Concentración
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM
NaF	25 mM
EDTA	5 mM
Sacarosa	0,3 M
Pepstatina	1 µM
Tabletas de cocktail inhibidor de proteasas Complete (Roche)	

Tabla I. Composición del medio buffer utilizado en la homogeneización.

Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Luego de homogeneizadas las muestras se transvasaron a tubos Eppendorff de 1500 µl para su centrifugación a 12000g durante 10 min. Se descartó el pellet y en el sobrenadante se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratorios, Inc. USA) utilizando albúmina bovina como estándar [Bradford MM, 1976].

A partir de las proteínas obtenidas se procedió del siguiente modo:

Para la valoración de pCaMKII, PLN total y sus formas fosforiladas, 30 µg de proteína se combinaron con un volumen apropiado de buffer de la muestra (SDS sample buffer) siendo resueltos mediante electroforesis utilizando geles de poli(acrilamida-dodecilsulfato de sodio) (SDS-PAGE) siguiendo la técnica descrita por Porzio y Pearson [Porzio MA, 1977]. La composición del gel de resolución fue: acrilamida 10% (con una relación acrilamida:bisacrilamida 30:1); Tris/Glicina 400 mM (1:3) pH: 8,8; Glicerol 5%; SDS 0,1 % y EDTA 0,2 mM. La composición del gel de apilamiento fue: acrilamida 4%; Tris-HCl 125mM pH 6,8 y SDS 0,1%. Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante (120 V) en buffer conteniendo: Tris 50 mM, Glicina 150 mM, SDS 0,1% (pH: 8,3). La transferencia semiseca de las proteínas a la membrana PVDF (membrana de polivinilo Immobilon-P, Millipore) se realizó en presencia del siguiente buffer: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 10%, a voltaje constante (12 V) durante una hora.

Terminada la transferencia, las membranas se bloquearon con buffer Tris-salino TBS: (Tris 50 mM - ClNa150 mM, pH 7,4) con 5% de leche descremada durante 1 hora, sin o con el agregado de 0,1% Tween según los distintos anticuerpos. Posteriormente las membranas se incubaron a 4°C, de 5 a 15 hs dependiendo del anticuerpo primario utilizado, con las siguientes diluciones de los mismos: para PLN fosforilada en su residuo T17 (pT17 PLN) y en su residuo Ser16 (pS16 PLN) (Badrilla) 1:5000 en TBS-5% leche, para la detección de PLN total (AffinityBioReagents) 1:2000 en TBS-1% leche, en el caso de pCaMKII (Abcam) 1:1000 en TBS-0,1% Tween-1% albúmina.

Para la inmunodetección de Bax, Bcl-2 y GAPDH, 40 µg de proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS preparados de acuerdo a la técnica Laemmli [Laemmli UK, 1970]. El gel separador contenía: acrilamida 7,5%; Tris 1,5 M pH: 8 y SDS 1% con un porcentaje de acrilamida de 15%. La corrida electroforética se desarrolló a voltaje constante (120 V) (Figura 28) en buffer conteniendo: Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% (pH 8,3). Los geles se transfirieron a membranas de PVDF y se bloquearon como se indicó más arriba. Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios. Para la detección de Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology) se utilizó una dilución 1:1000 preparada en TBS-0,1% Tween-1% leche, para la de Bax (Santa Cruz Biotechnology) se empleó una dilución 1:2000 en TBS-0,1% Tween-1% leche y para GAPDH (Millipore) 1:5000 en TBS-0,1% Tween-1% leche.

La detección de RyR2 y sus formas fosforiladas (S2814 y S2808) se llevó a cabo del siguiente modo: 100 µg de proteínas con un volumen apropiado de buffer de la muestra se separaron en geles de poliacrilamida-SDS preparados según la técnica de Laemmli utilizando un porcentaje de acrilamida de 3% para el gel apilador y 6% para el gel separador. La corrida electroforética transcurrió a voltaje constante de 120 V. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (transferencia húmeda a voltaje constante de 25 V, a 4°C durante 15 hs); luego las membranas se bloquearon con buffer TBS-5% leche-0,1% Tween durante 1 h. Posteriormente se incubaron 5 hs a 4°C con los anticuerpos primarios en dilución

1:5000 en TBS-0,1% Tween-1% leche para RyR2 (Affinity Bioreagents), RyR2 fosforilado en Ser2808 (pS2808, Badrilla) y en Ser2814 (pS2814, Badrilla).

En todos los casos se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa. La inmunorreactividad se visualizó mediante el kit de detección de quimioluminiscencia basado en peroxidasa, ECL Plus (AmershamBiosciences, Pittsburgh, PA, EE.UU.). La intensidad de señal de las bandas en las inmunotransferencias se cuantificó por densitometría utilizando el software Image J (NIH, EE.UU.)

## **AISLAMIENTO DE MIOCITOS**

Para la determinación de las corrientes de  $Ca^{2+}$  a nivel celular, corazones aislados y montados en un sistema Langendorff fueron perfundidos a  $37^{\circ}C$  con una solución de buffer HEPES conteniendo (en mM): 146.2 ClNa, 4,69 ClK, 1  $Cl_2Ca$ , 10 HEPES, 0.35  $H_2PO_4Na$ , 1,05  $SO_4Mg$ , 11 Glucosa). La solución fue gaseada constantemente con  $O_2$  al 100% (al igual que el resto de las soluciones utilizadas) [Vila-Petroff, 2007]. Después de un período de 4 min de perfusión, la solución fue reemplazada por otra libre de  $Ca^{2+}$  durante 6 min. Transcurrido este tiempo, se adicionó a la solución de HEPES, 50  $\mu M$  de  $Cl_2Ca$ , colagenasa (300 U/ml), proteasa (0,1 mg/ml) y albúmina de suero bovino al 1% (BSA), con el objetivo de iniciar la separación de los miocitos. La perfusión se mantuvo hasta que se evidenció flaccidez en el tejido miocárdico (14-18 min). Luego, se separó el tejido ventricular realizando un corte a nivel de la unión aurículo-ventricular y los ventrículos fueron cortados en pequeñas piezas. El tejido fue posteriormente inmerso en la solución de enzimas proteolíticas descrita, en constante agitación a  $37^{\circ}C$  entre 5 a 10 min dependiendo del grado de digestión evaluado por microscopía. Los miocitos libres fueron lavados sucesivas veces con solución de HEPES al 1% de BSA y a concentraciones crecientes de  $Cl_2Ca$  hasta llegar a una concentración final de 1 mM. Las células fueron mantenidas en estas condiciones, a temperatura ambiente hasta su utilización.

## MEDICIÓN DE LA CORRIENTE DE $\text{Ca}^{2+}$ ( $I_{\text{Ca}^{2+}}$ ) EN MIOCITOS AISLADOS

Los miocitos ventriculares aislados se colocaron en una cámara de perfusión conteniendo la solución de HEPES ya descripta para el aislamiento. Se utilizó la técnica llamada patch-clamp en configuración *whole-cell*. Básicamente, se accede a la membrana celular con una micropipeta de vidrio y se forma un sello de alta resistencia y estabilidad mecánica. Luego el sello se rompe por succión accediéndose al interior de toda la célula. Esto permite el intercambio de moléculas entre el citoplasma y la solución interna con la cual se llena la pipeta y realizar los registros de corriente macroscópica (voltage-clamp) con un amplificador de patch-clamp (Axopatch 200A, Axon Instruments) [Aiello EA, 2001] (Figura 27). La punta de la

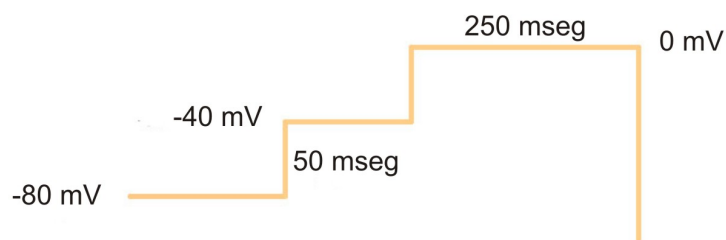


**Figura 27. Equipo de Patch-clamp.** En el monitor superior se observa un microcito formando el sello con la micropipeta.

pipeta se posicionó encima de la célula conteniendo una solución similar al citoplasma compuesta por (en mM): 140CsCl, 1Cl<sub>2</sub>Mg, 5Na<sub>2</sub>ATP, 5EGTA, 10Hepes, pH ajustado a 7.2 con OHNa. Se utilizó como electrodo de referencia un alambre de Ag/AgCl en contacto con la solución extracelular.

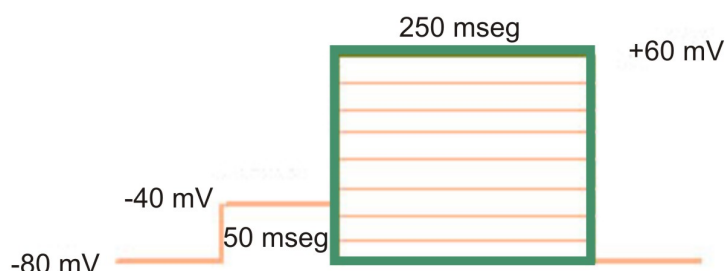
Las corrientes (filtradas a 1 kHz) se registraron directamente a través de un convertidor analógico-digital (Digidata 1200, Axon Instruments) que permite enviar las señales de potencial adecuadas al amplificador y digitalizar las señales de corriente recibidas de éste. El control de instrumentos y registro de señales se realiza mediante el software pClamp y Axotape (Axon Instruments).

Para llevar a cabo estas determinaciones, se generaron pulsos despolarizantes (250 mseg) fijando el voltaje a 0,2 Hz. El potencial de mantenimiento utilizado



**Figura 28. Protocolo utilizado en medición de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $i_{\text{Ca}}$ ) en miocitos aislados. Protocolo 1: Pulso de voltaje a 0mV para ver corriente pico.**

fue de -80 mV para prevenir la inactivación lenta y minimizar la caída de corriente. Se empleó un prepulso de 50 mseg a -40 mV, para inactivar los canales de  $\text{Na}^+$  y el potencial de los canales tipo T de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se utilizaron 2 protocolos involucrando el pulso de prueba (**Figura 28 y 29**), el primero consistió en un único pulso a 0 mV con el objetivo de evaluar la corriente pico de  $\text{Ca}^{2+}$ . El segundo protocolo se confeccionó con escalones de 10 mV, comenzando en -80 mV y finalizando en +60 mV, con el objetivo de visualizar la dependencia de la corriente al voltaje. Las



**Figura 29. Protocolo utilizado en medición de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $i_{\text{Ca}}$ ) en miocitos aislados. Protocolo 2: Pulsos despolarizantes para ver la dependencia de la corriente al voltaje (curva I/V).**

corrientes evocadas por los pulsos de prueba mostraron una cinética de activación e inactivación consistentes con las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Para cada célula, se registró la corriente capacitiva de la membrana, normalizando las corrientes por la capacitancia de la célula.

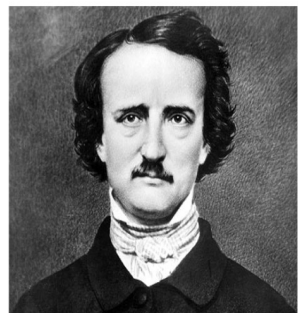


# Resultados



*«Todo lo que vemos o creemos es un sueño dentro de un sueño».*

**Edgar Allan Poe (1809-1849)**



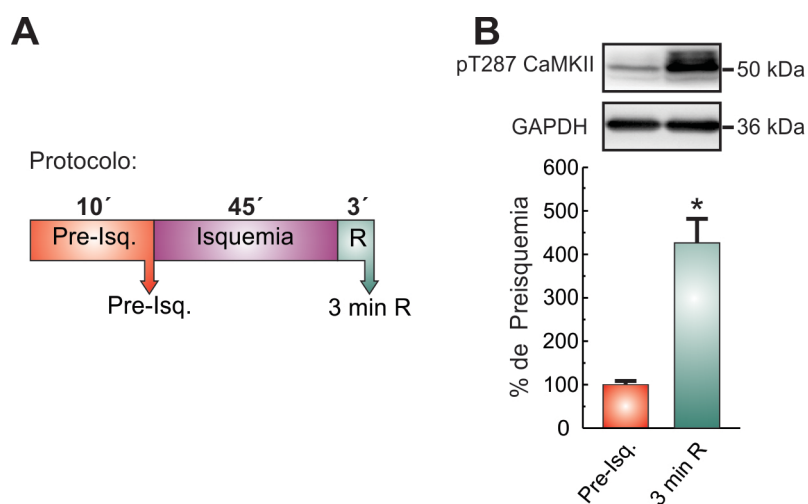
Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, se presentan de acuerdo a los objetivos planteados:

## DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFORILACIONES DEL RS DEPENDIENTES DE CAMKII EN LA INJURIA POR I/R

Para llevar a cabo este primer objetivo, realizamos experimentos con el fin de examinar la existencia de cambios en el patrón de fosforilación del residuo T287 de CaMKII, índice de su activación. Corazones aislados de ratones C57BL/6 fueron

sometidos a un protocolo de I/R (I45 minutos/R3 minutos). La elección del tiempo de reperfusión se basó en resultados de experimentos previos, realizados en rata, donde se comprobó que la máxima fosforilación del sitio T17 de PLN, sustrato específico de CaMKII, se producía a los 3 minutos del comienzo de la R [Vila Petroff M, 2007]. En la **Figura 30** se pueden observar los resultados obtenidos. Un incremento significativo en los niveles de autofosforilación de CaMKII respecto a los niveles pre-isquémicos fue evidente a los 3 minutos de R.

Habiendo demostrado que CaMKII está activada al comienzo de la R, decidimos caracterizar la expresión y fosforilación de sus proteínas blanco en el RS, (T17 de PLN y S2814 del RyR2), a distintos tiempos durante la R. Para valorar la posible activación adrenérgica en nuestro modelo, también evaluamos la presencia de fosforilaciones de los sitios dependientes de PKA, S16 de PLN y S2808 del RyR2.



**Figura 30. La reperfusión incrementa la auto-fosforilación de CaMKII.** (A) Esquema del protocolo experimental: las flechas indican los momentos en los cuales fueron congelados los corazones para su análisis. (B) Western Blots representativos y resultados promedio de la auto-fosforilación de CaMKII. Los datos representan la media  $\pm$  ES de 3 a 5 corazones \*  $P < 0,05$  vs. Pre-Isq.

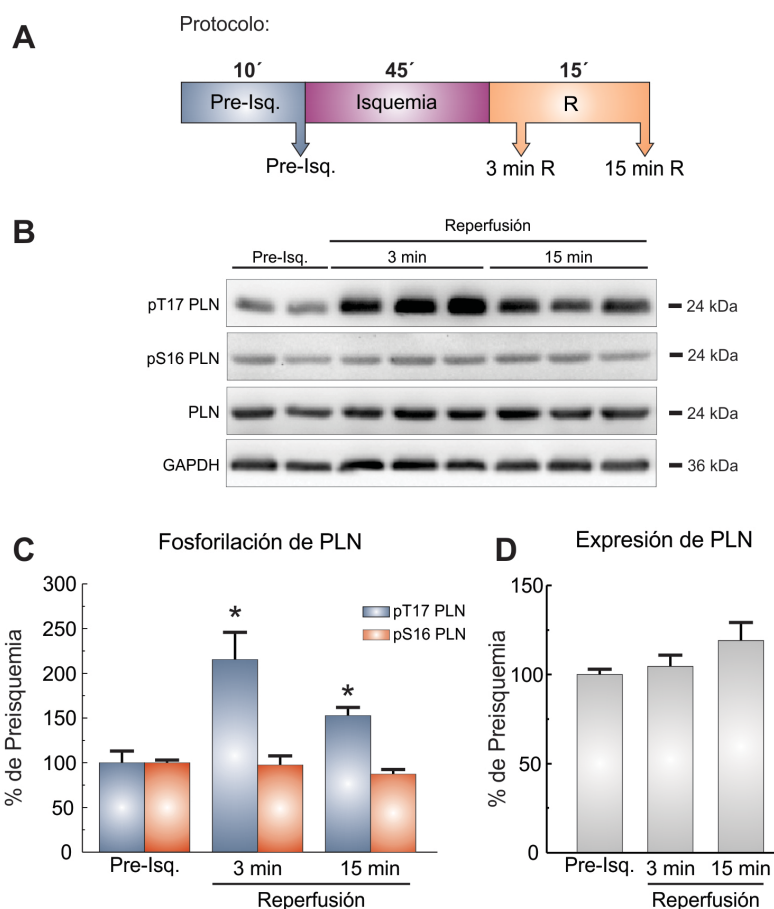
Con el fin descripto, corazones de ratones C57BL/6 fueron congelados al final de la pre-isquemia y al cumplirse los 3 y 15 minutos de R.

Esta serie de experimentos permitió detectar un incremento significativo, en la fosforilación del sitio T17 de PLN a los tiempos estudiados de R sin cambios en los niveles de expresión de PLN (Figura 31).

El aumento observado en la fosforilación de T17 se correspondió temporalmente con un incremento significativo de la fosforilación del residuo S2814 del RyR2 a los 3 minutos

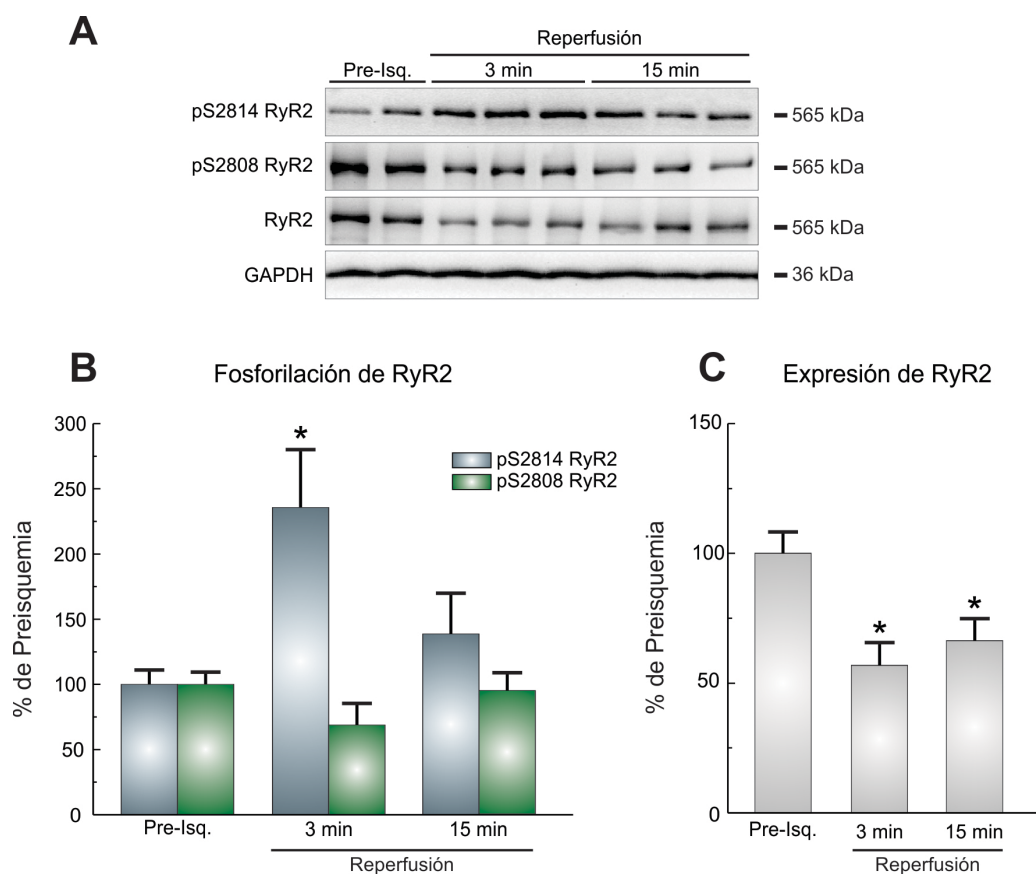
de reperfusion que persistió a los 15 minutos aunque sin alcanzar diferencias estadísticas. La expresión de la proteína RyR2 presentó un descenso significativo a los tiempos estudiados, dato que coincide con resultados previos de nuestro grupo y otros [Salas MA, 2010; Pedrozo Z, 2010] (Figura 32).

Al examinar la fosforilación en los sitios PKA dependientes, S16 de PLN y S2808 del RyR2, no se detectaron cambios respecto a los niveles pre-isquémicos (Figuras 31 y 32). En base a estos resultados descartamos en nuestro protocolo la participación de una vía dependiente de PKA, que pudiera estar influyendo en el efecto deletéreo.



**Figura 31. La reperfusion incrementa la fosforilación de PLN dependiente de CaMKII.** (A) Esquema del protocolo experimental: las flechas indican los momentos en los cuales fueron congelados los corazones. (B) Western Blots representativos de la inmunodetección de pT17, pS16, PLN total y GAPDH. (C) Resultados promedio de la fosforilación del sitio T17 y S16 y (D) de la expresión de PLN. Los datos representan la media  $\pm$  ES de 3-4 corazones por grupo. \*  $P < 0,05$  vs. Pre-Isq.

Una vez comprobado que durante la I/R se producía activación de CaMKII y fosforilación de sus sustratos en el RS, decidimos establecer el grado de participación de estas fosforilaciones en la producción del daño.



**Figura 32. La reperfusion incrementa significativamente la fosforilación dependiente de CaMKII en RyR2.** (A) Western Blots representativos de la inmunodetección de, pS2814, pS2808, RyR2 total y GAPDH. (B) Resultados promedio de la fosforilación de los sitios S2814 y S2808 y (C) de los niveles de expresión de RyR2. Los datos representan la media  $\pm$  ES de los valores de 7 a 9 corazones por grupo. \*  $P < 0,05$  vs. Pre-Isq.

Realizamos experimentos de I/R en ratones de la cepa SR-AIP. Estos ratones, como ya fue descrito, expresan un inhibidor específico de la CaMKII (AIP) limitado al RS. Se examinó la fosforilación de T17 de PLN al inicio de la reperfusion, evaluándose además, la recuperación contráctil, el tamaño del infarto, la liberación de LDH y la presencia de apoptosis una vez finalizado el protocolo.

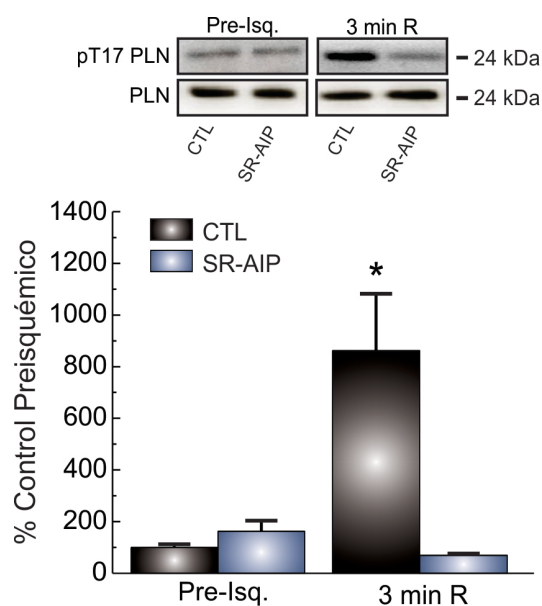
Como era esperable, la inmunodetección de la fosforilación de T17 en ratones SR-AIP, no mostró cambios respecto a los valores pre-isquémicos. Sin

embargo se detectó un aumento en la fosforilación de este sitio en los ratones controles (CTL) al inicio de la reperfusión (**Figura 33**).

Comprobada la ausencia de actividad de la quinasa en estos ratones, y con los antecedentes del rol deletéreo de CaMKII en la I/R, esperábamos que los ratones SR-AIP, mostraran mayor tolerancia al protocolo experimental.

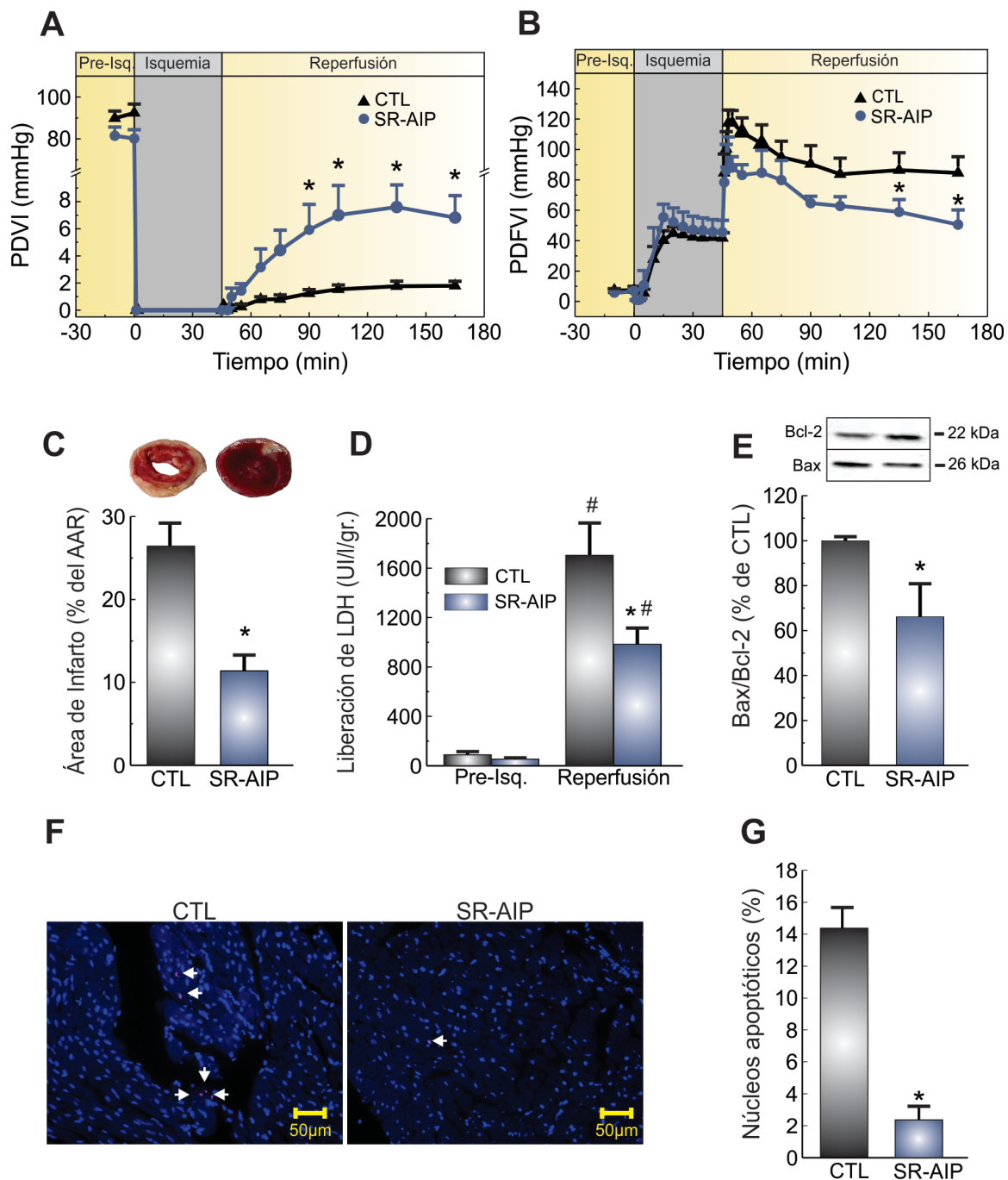
El análisis de la función ventricular durante la reperfusión, reveló una mejor recuperación de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) y un descenso en los valores de la presión diastólica final (PDFVI), en los SR-AIP respecto a los controles (**Figura 34 A y B**). El área de infarto medida por la tinción con TTC, fue menor en los ratones SR-AIP (**Figura 34 C y D**) y esto se correspondió con una disminución en la liberación de la enzima LDH en el efluente de reperfusión, indicando atenuación de la necrosis.

La evaluación del grado de apoptosis por medio de Western Blot (cociente Bax/Bcl-2) y de microscopia de fluorescencia (TUNEL) demostró menor incidencia de este tipo de muerte celular en los ratones con inhibición de las fosforilaciones dependientes de CaMKII en el RS (**Figura 34 E, F y G**).



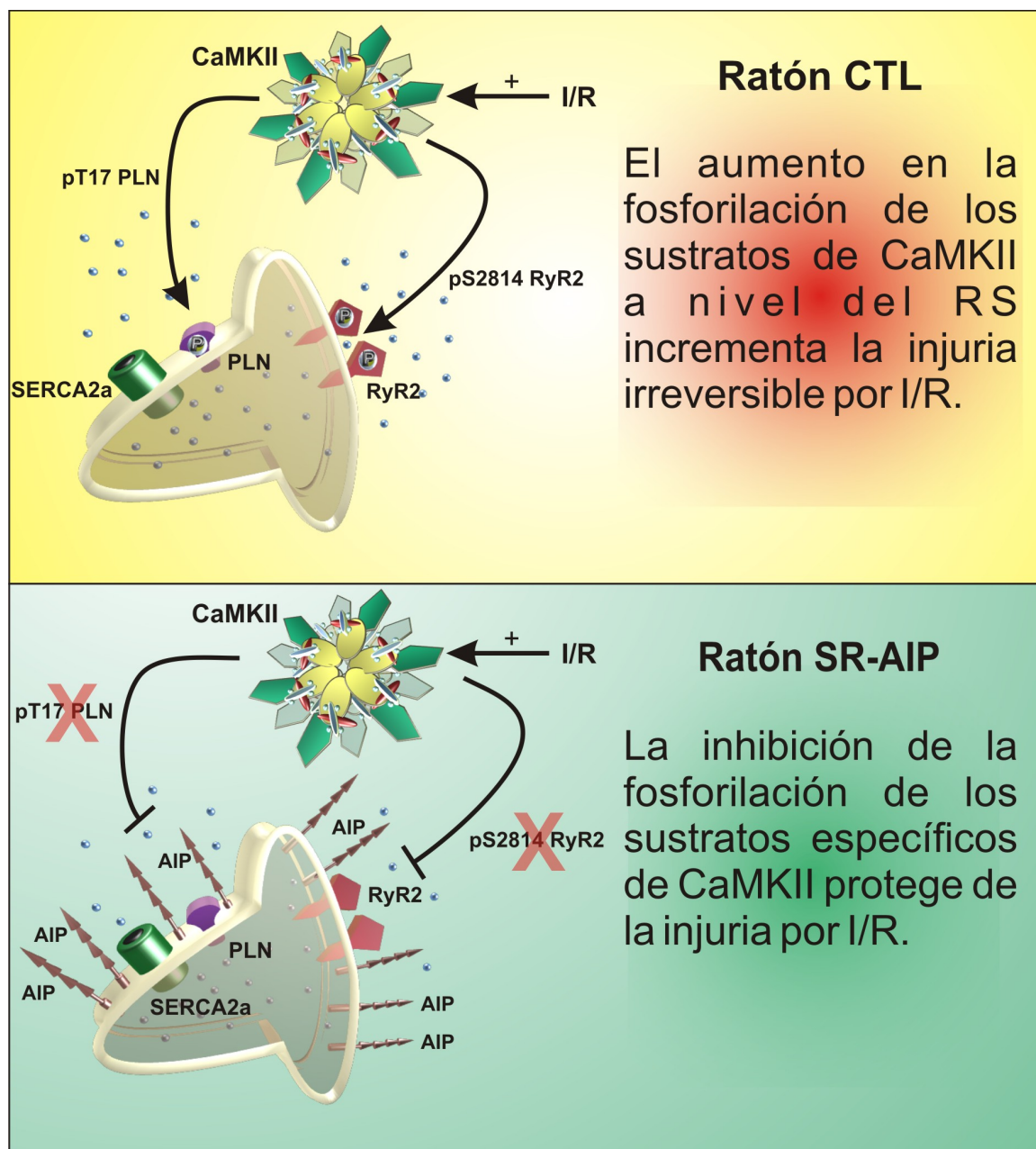
**Figura 33. Ausencia de fosforilación de T17 de PLN en ratones SR-AIP.** Western Blots representativos y resultados promedio de la inmunodetección de pT17 de PLN a los 3min de reperfusión. Los datos representan la media  $\pm$  ES de los valores de 3 a 6 corazones por grupo. \*  $P < 0,05$  vs. Pre-Isq.





**Figura 34. La inhibición de las fosforilaciones dependientes de CaMKII a nivel del RS reduce el daño en la injuria irreversible por I/R.** (A) Transcurso en el tiempo de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDI) y (B) de la presión diastólica final (PDFVI). (C) Rodajas representativas y valores promedio del área de infarto. (D) LDH liberada durante los primeros 10 minutos de la reperfusion. (E) Western Blots y resultados promedio del cociente Bax/Bcl2. (F) Imágenes representativa de la tinción de TUNEL donde se señalan núcleos apoptóticos y (G) resultados promedio del ensayo. Los datos representan la media  $\pm$  ES de n = 7-13 corazones por grupo. \* P<0.05 vs CTL. #P=<0,05 vs. Pre-Isq.

En la **Figura 35** se esquematizan los resultados obtenidos en los experimentos hasta aquí presentados. El diagrama pone de relieve que la activación de CaMKII en corazones sometidos a I/R, ejerce un efecto deletéreo a través de la fosforilación de sus proteínas blanco a nivel del RS.



**Figura 35.** Efecto de la activación de los sustratos de CaMKII a nivel del RS en isquemia y reperfusión.

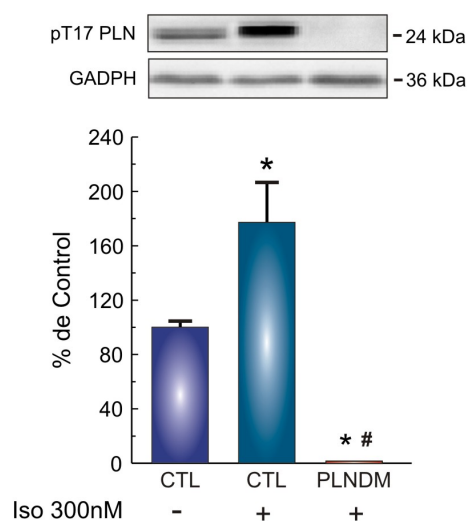


## DISECCIÓN DEL ROL DESEMPEÑADO POR CADA UNA DE LAS FOSFORILACIONES DEPENDIENTES DE CaMKII A NIVEL DEL RS

El siguiente objetivo fue dilucidar qué nivel de participación tenía cada una de las proteínas blanco de CaMKII en el RS, PLN y RyR2, en la producción del daño miocárdico producido durante la I/R.

Para estudiar la relevancia que en el proceso deletéreo pudiera tener la fosforilación de PLN dependiente de CaMKII, realizamos experimentos en ratones transgénicos doble mutantes de PLN. En ellos, tanto el sitio dependiente de PKA (S16) como el de CaMKII (T17) han sido mutados a alanina impidiendo su fosforilación (PLNDM). La incapacidad de PLN de ser fosforilada determina un efecto inhibitorio permanente sobre la actividad de la SERCA2a

En primer lugar y para comprobar la presencia de la mutación, se estudió la fosforilación de T17 de PLN en presencia del agonista  $\beta$ -adrenérgico Isoproterenol (Iso) a una dosis que induce la máxima fosforilación de esta proteína (300nM) [Said M, 2002]. Como se observa en la **Figura 36**, los corazones provenientes de ratones controles (CTL) tratados con Iso, presentaron un aumento del 80% en la fosforilación de T17, en tanto que no hubo niveles detectables de fosforilación en los corazones de ratones PLDM.



**Figura 36. Ausencia de fosforilación de T17 de PLN en ratones PLNDM sometidos a estimulación  $\beta$ -adrenérgica.** Western Blots representativos y resultados promedio de la fosforilación de T17 de PLN en ausencia (-) y presencia (+) de Isoproterenol 300nM en corazones de ratones CTL y PLNDM (Iso 300nM). Los datos representan la media  $\pm$  ES de los valores de 3-4 corazones por grupo. \*  $P < 0,05$  vs CTL.

En la **Figura 31** ya se mostró que, a diferencia de lo que ocurre con T17, la fosforilación de S16 de PLN no presenta cambios durante el protocolo de I/R. Por lo tanto el efecto que observemos en estos ratones podrá ser atribuido a la falta de fosforilación de T17.

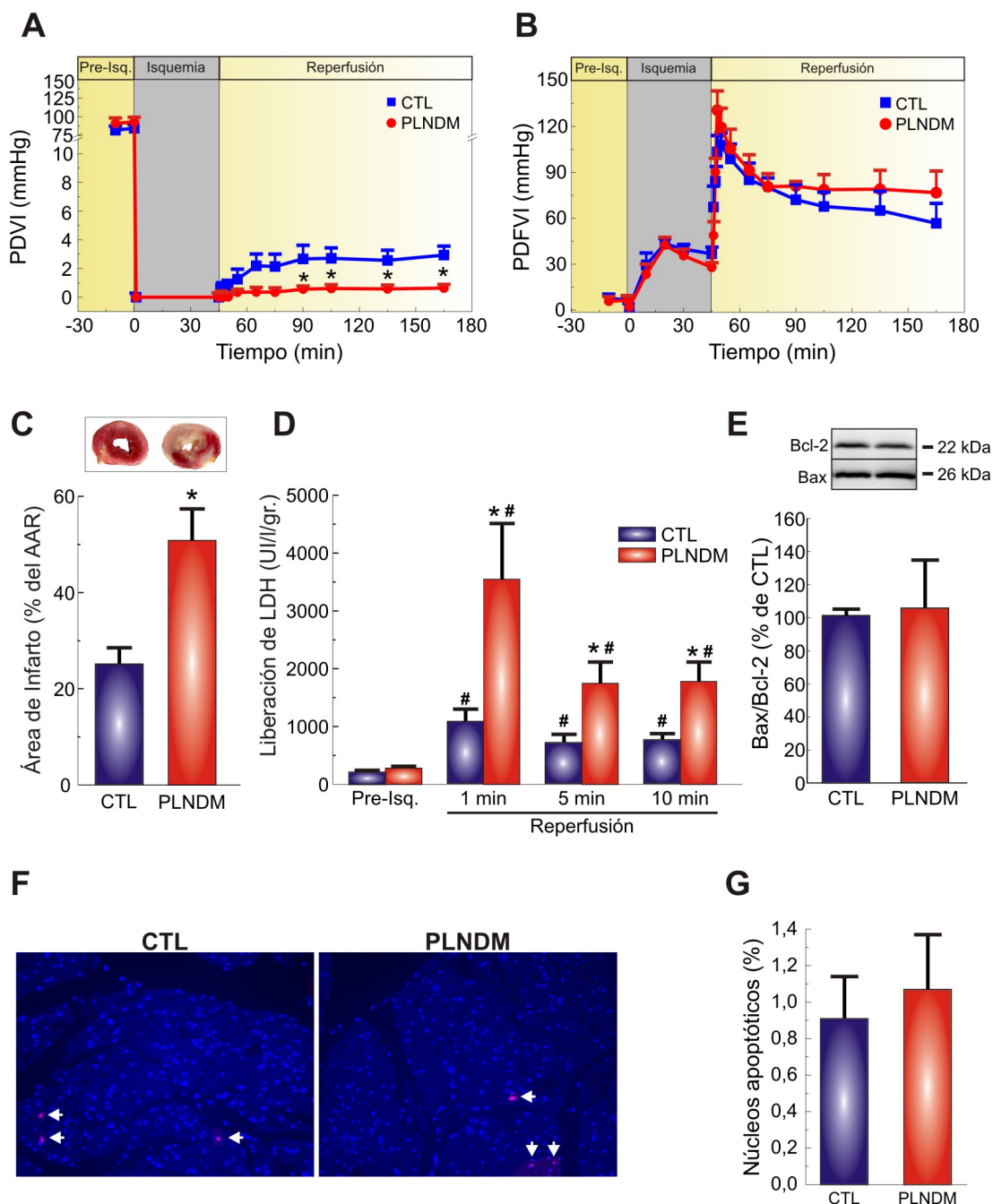
En experimentos posteriores, corazones aislados de ratones controles y transgénicos fueron sometidos al protocolo de I/R, evaluándose parámetros contráctiles y de viabilidad celular (**Figura 37**).

En los corazones de PLNDM se observó un mayor deterioro mecánico que en los de ratones controles manifestado por una menor PDVI y un incremento en la PDFVI (**Figura 37 A y B**) durante la reperfusión.

Los resultados indican que los ratones PLNDM muestran una disminución de la viabilidad celular evidenciada por una mayor extensión del área de infarto respecto al grupo control, lo cual se correlacionó con un aumento en los niveles de LDH en el efluente de reperfusión (**Figura 37 C y D**). Llamativamente, al analizar la relación entre proteínas pro y antiapoptóticas (Bax/Bcl-2 respectivamente) y cuantificar los núcleos apoptóticos por la técnica de TUNEL, no se encontraron diferencias en el grado de apoptosis entre las dos cepas de ratones (**Figura 37 E, F y G**).

Una característica presente en estos ratones transgénicos que debimos tener en cuenta al momento de sacar conclusiones de los experimentos

realizados, es la presencia de un aumento del 20% en la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales tipo L (LTCC) [Brittsan AG, 2003]. Esta mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido interpretada como un mecanismo compensador que les permite mantener una contractilidad basal similar a la de los ratones controles. Se decidió explorar entonces si este aumento de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  contribuía al aumento del daño observado en los ratones PLNDM expuestos a I/R.



**Figura 37. La ausencia de fosforilación de PLN incrementa la injuria por I/R.** (A) Transcurso en el tiempo de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) y (B) de la presión diastólica final (PDFVI). (C) Rodajas representativas y valores promedio del área de infarto. (D) LDH liberada durante los primeros 10 minutos de la reperusión. (E) Western Blots y resultados promedio del cociente Bax/Bcl2. (F) Imágenes representativa de la tinción de TUNEL donde se señalan núcleos apoptóticos y (G) resultados promedio del ensayo. Los datos representan la media  $\pm$  ES de n = 7-14 corazones por grupo. \* P=0.05 vs CTL. #P=0,05 vs. Pre-Isq.

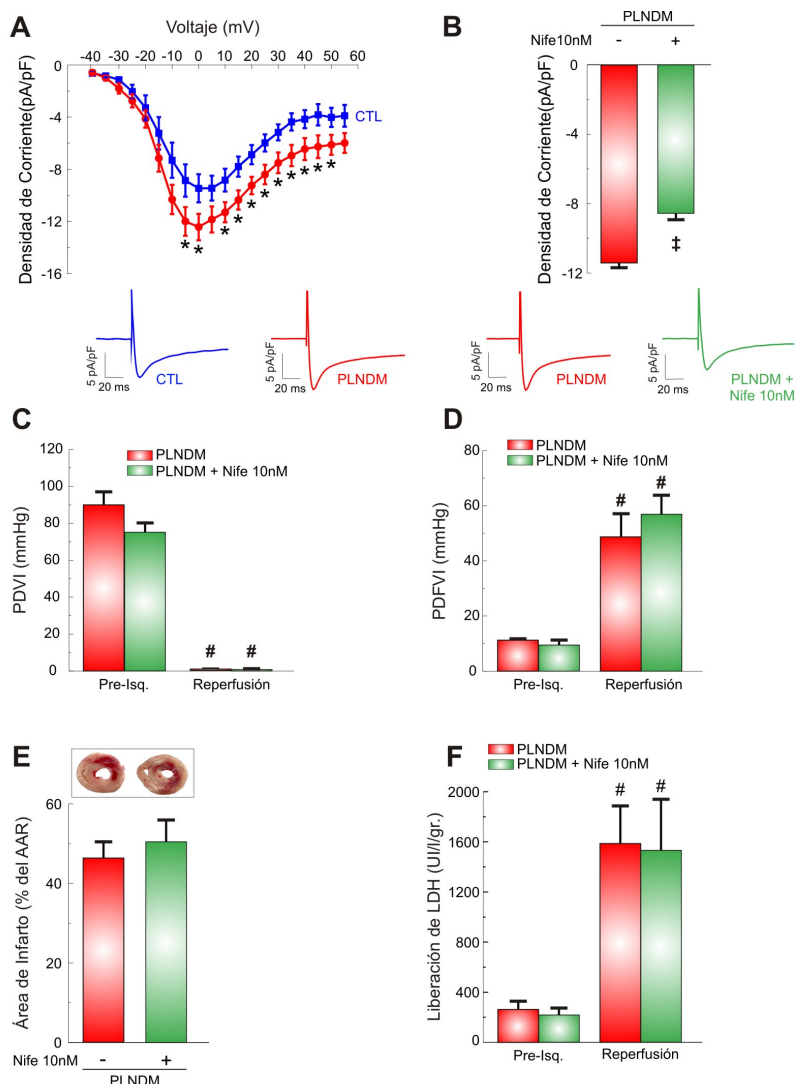
## Experimentos

utilizando la técnica de patch-clamp realizados en miocitos cardíacos aislados de ratones PLNDM y CTL, permitieron detectar en los primeros, el aumento en la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  descrito. Esto se muestra en la relación corriente-voltaje de la

**Figura 38 A.** Se realizaron luego experimentos en miocitos de ratones PLNDM registrando la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  por los LTCC en presencia de distintas dosis de nifedipina (bloqueante de estos canales), hasta alcanzar aquella que anulara el aumento descrito (10nM). En la **Figura 38 B** se muestran los resultados promedio

de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  al pico registrada en miocitos de PLDM antes y después de agregar la dosis señalada de nifedipina observándose la disminución de aproximadamente 20% en la densidad de la misma.

Una vez establecida la dosis de nifedipina efectiva, corazones aislados de ratones PLNDM fueron sometidos a I/R en presencia o ausencia del bloqueante



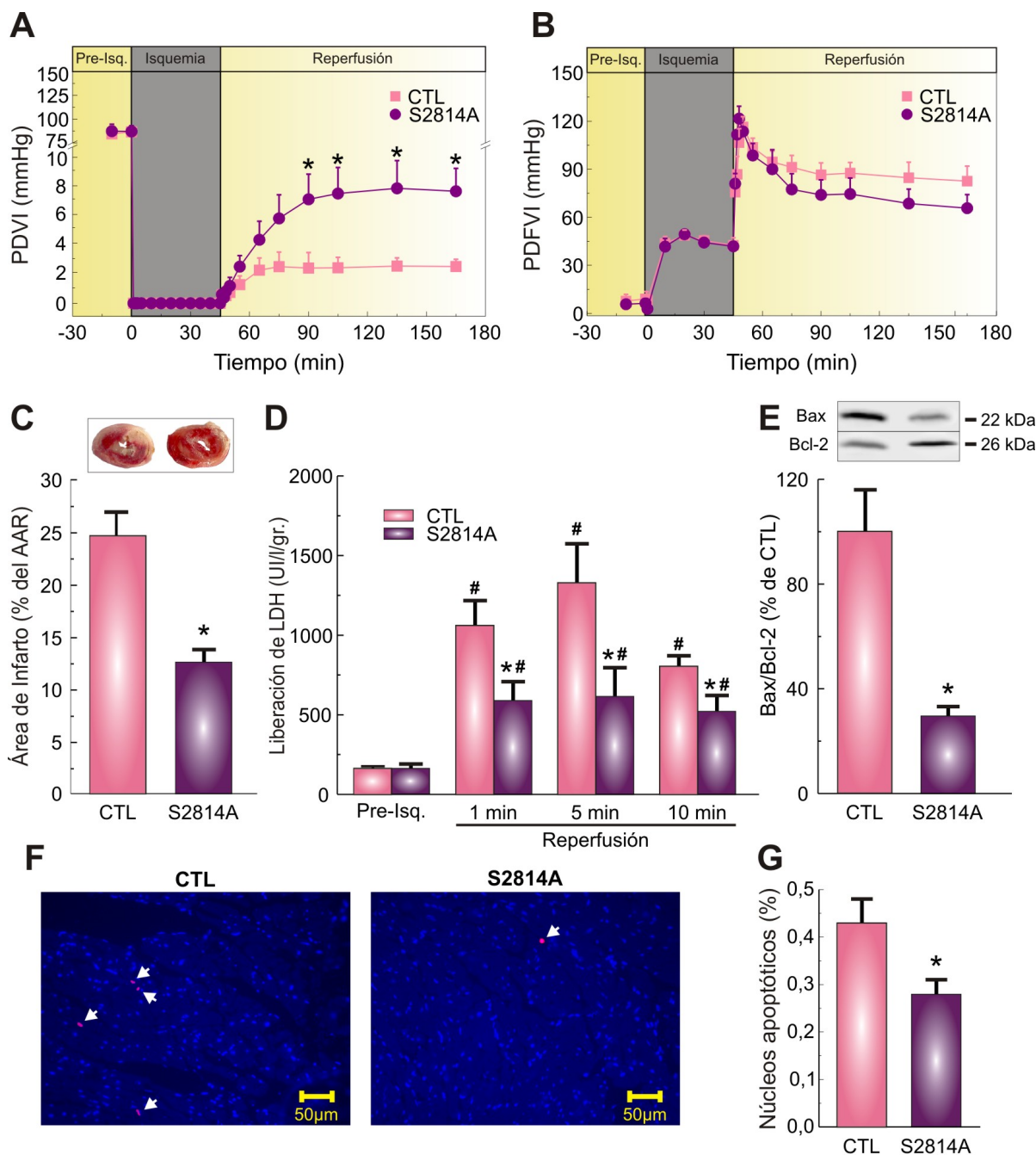
**Figura 38. El aumento de la injuria por I/R en ratones PLNDM no es debido al incremento de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ .** (A) Datos promedio de la relación corriente-voltaje y trazos representativos de  $I_{\text{Ca}}$  obtenidos en miocitos de corazones CTL (n=8) y PLNDM (n=11). (B) Trazos representativos de  $I_{\text{Ca}}$  registrados en miocitos de ratones PLNDM y datos promedio de densidad de  $I_{\text{Ca}}$  registrados a 0 mV, antes y después de agregar nifedipina (Nife). (C) Presión desarrollada (PDVI) y (D) presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI) en la presiquemia (Pre-Isq.) y al finalizar la Reperusión. (E) Tamaño del infarto al final del periodo de reperusión y (F) Liberación de LDH durante los primeros 10 minutos de la reperusión en corazones PLDM con y sin Nife. Los datos de C a F representan la media  $\pm$  ES de n = 4-14 corazones por grupo. \*  $P < 0.05$  vs. CTL; ‡  $P < 0.05$  PLNDM vs. PLNDM + Nife 10nM; #  $P < 0,05$  vs. Pre-Isq.

evaluándose la viabilidad celular y la contractilidad. La **Figura 38 C y D** muestra que, en presencia o ausencia de nifedipina, la recuperación contráctil al final de la reperfusión fue similar (PDVI y PDFVI). El tamaño del infarto y la liberación de LDH tampoco difirieron por la administración del inhibidor (**Figura 38 E y F**). Es de destacar que la concentración empleada de nifedipina provocó una ligera disminución de la PDVI durante el período de estabilización, aunque ésta no alcanzó niveles significativos. Estos experimentos permiten afirmar que el deterioro contráctil y la menor sobrevida celular presentes en los ratones PLNDM sometidos a I/R, no es debido al aumento compensador de la corriente de  $Ca^{2+}$  tipo L.

En conjunto, los experimentos realizados en ratones PLDM sugieren que la fosforilación del sitio T17 de PLN, no es responsable del efecto deletéreo producido por la activación de CaMKII al inicio de la reperfusión. Por el contrario, esa fosforilación parece cumplir un rol beneficioso, limitando el tamaño del infarto.

A continuación evaluamos el grado de participación que, en el daño por I/R, pudiera tener el otro blanco de CaMKII a nivel de RS, el RyR2 (S2814). Una de las estrategias empleadas para cumplir con este objetivo fue realizar experimentos en ratones knock-in, en los que el sitio de fosforilación S2814 del RyR2 está mutado a alanina y por lo tanto no puede fosforilarse (S2814A) [Chelu, 2009]. Utilizar ratones con ésta modificación genética, nos permitiría corroborar lo descripto por otros investigadores en cuanto a que el aumento en la fosforilación del RyR2, por conducir a la pérdida diastólica de  $Ca^{2+}$ , es un factor determinante en la patogenia de diversas enfermedades cardiovasculares [Ling H, 2013; Sossalla S, 2010].

Los resultados obtenidos aplicando nuestro protocolo experimental se observan en la **Figura 39**.



**Figura 39. Impedir la fosforilación dependiente de CaMKII en el RyR2, protege de la injuria por I/R.** (A) Transcurso en el tiempo de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) y (B) de la presión diastólica final (PDFVI) durante el protocolo de I/R. (C) Rodajas representativas y valores promedio del área de infarto. (D) LDH liberada durante los primeros 10 minutos de la reperfusion. (E) Western Blots y resultados promedio del cociente Bax/Bcl2. (F) Imágenes representativa de la tinción de TUNEL donde se señalan núcleos apoptóticos y (G) resultados promedio del ensayo. Los datos representan la media  $\pm$  ES de n = 5-12 corazones por grupo. \* P< 0.05 vs. CTL. #P< 0,05 vs. Pre-Isq.

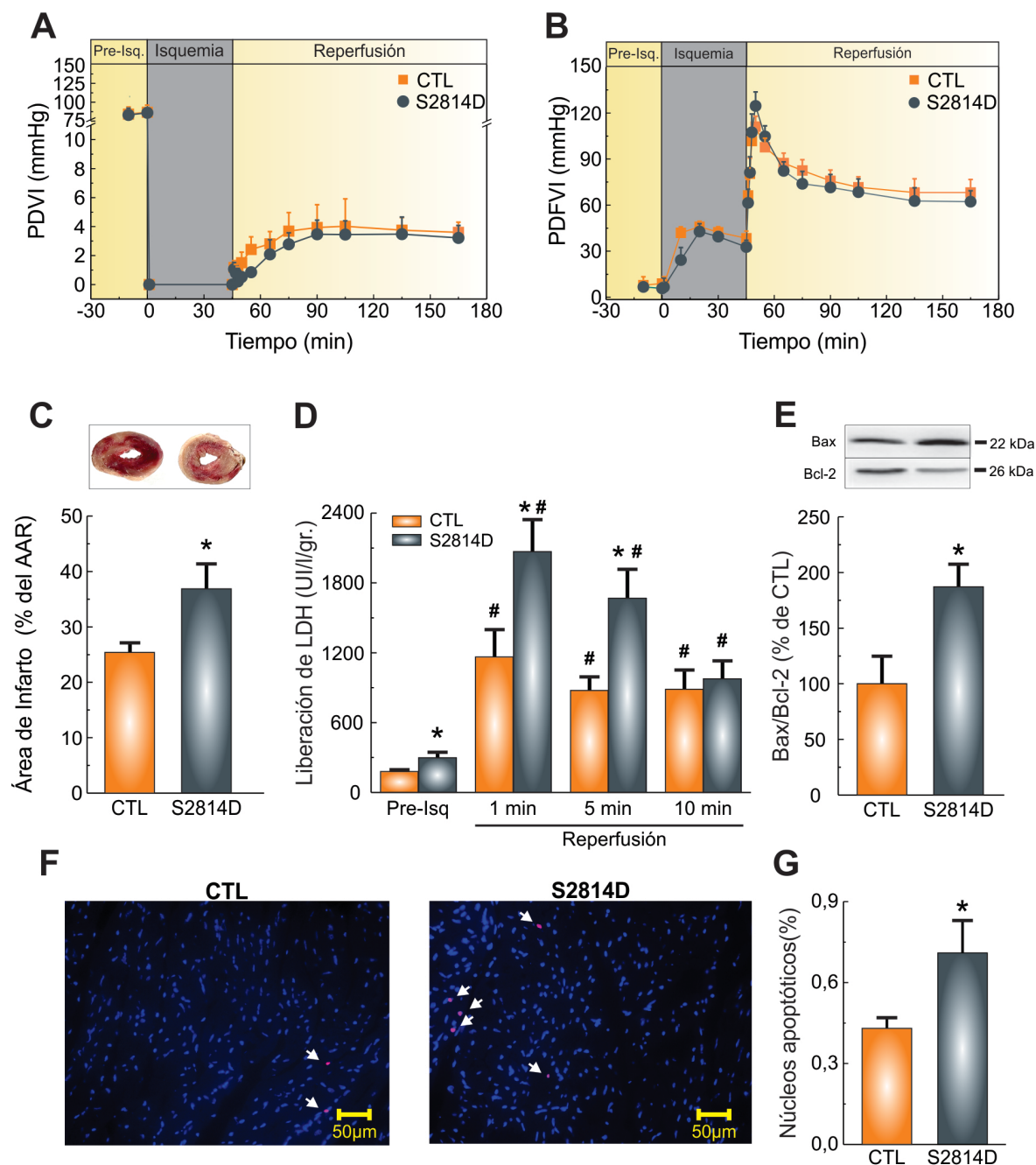


La prevención de la fosforilación del RyR2 en los corazones de ratones S2814A se tradujo en una mejor recuperación contráctil evidenciada por un aumento de la PDVI acompañado de disminución de la PDFVI respecto a los corazones controles. Cabe señalar que no hubo diferencias en la contractilidad basal entre ambas cepas.

Al evaluarse la viabilidad celular, se observó que los corazones de ratones S2814A presentaban un menor tamaño de infarto que los CTL ( $12,6 \pm 1,2\%$  y  $24,6 \pm 2,2\%$  respectivamente) (**Figura 39 C**). Coincidentemente, hubo una reducción significativa de los niveles de LDH en el efluente coronario durante los primeros 10 minutos de reperfusión (**Figura 39 D**). Para evaluar si, impedir la fosforilación del RyR2 afectaba también el grado de apoptosis, se examinó por Western Blot la relación Bax/Bcl-2 y el número de núcleos apoptóticos (TUNEL). Ambos parámetros resultaron significativamente menores en el grupo S2814A respecto a los corazones CTL (**Figura 39 E, F y G**).

Los resultados de este grupo de experimentos sugieren que la fosforilación del residuo S2814 del RyR2 sería responsable de las acciones deletéreas producidas por la activación de CaMKII durante las fases tempranas de la reperfusión.

Con la finalidad de dar mayor sustento a estos hallazgos, realizamos experimentos en ratones transgénicos donde el sitio de RyR2 fosforilable por CaMKII, S2814, estaba mutado de forma tal de imitar una fosforilación constitutiva del mismo (S2814D) [van Oort, 2010]. Los resultados obtenidos se observan en la **Figura 40**.



**Figura 40. La fosforilación constitutiva dependiente de CaMKII en el RyR2 incrementa la injuria por I/R.** (A) Transcurso en el tiempo de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) y (B) de la presión diastólica final (PDFVI) durante el protocolo de I/R. (C) Rodajas representativas y valores promedio del área de infarto. (D) LDH liberada durante los primeros 10 minutos de la reperusión. (E) Western Blots y resultados promedio del cociente Bax/Bcl2. (F) Imágenes representativa de la tinción de TUNEL donde se señalan núcleos apoptóticos y (G) resultados promedio del ensayo. Los datos representan la media  $\pm$  ES de n = 7-12 corazones por grupo. \* P < 0.05 vs. CTL. #P < 0,05 vs. Pre-Isq.

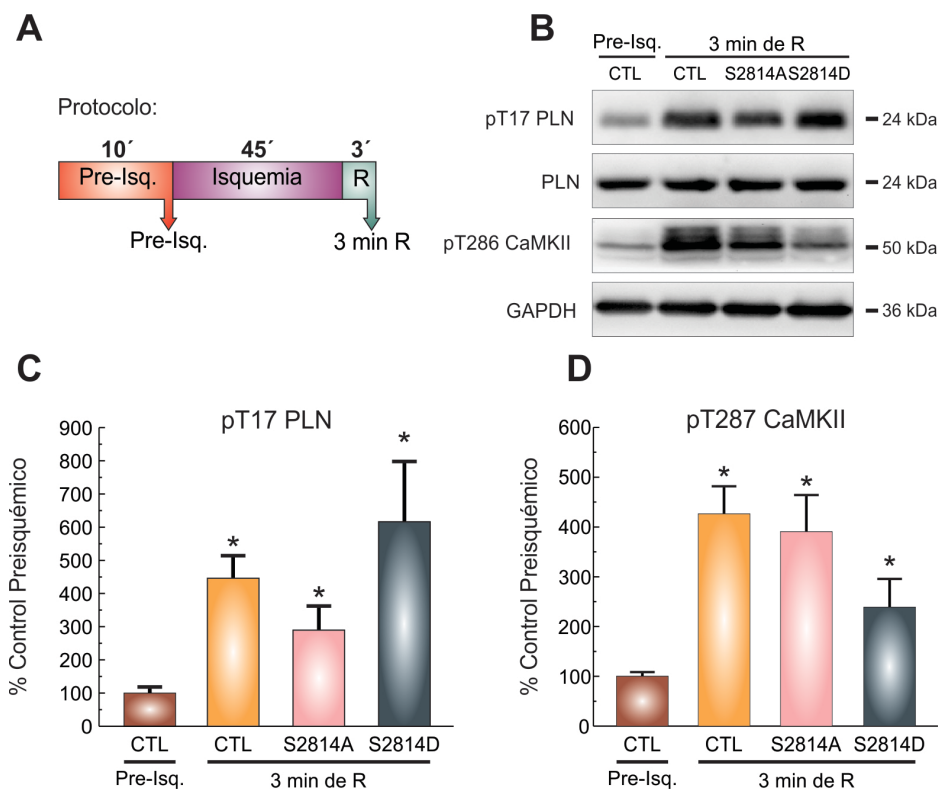
Estos ratones transgénicos presentaron una contractilidad basal similar al grupo CTL y la recuperación mecánica post-isquémica evaluada a través de la

PDVI y la PDFVI no difirió de los CTL (**Figura 40 A y B**). Sin embargo, el tamaño del infarto medido al final del protocolo de I/R fue significativamente mayor en los ratones transgénicos, como se muestra en la figura **Figura 40 C**. Un hallazgo interesante fue que la liberación de LDH en los S2814D ya en el período preisquémico, superó significativamente a la de los controles, y esa diferencia continuó hasta los 5 minutos de reperfusión, desapareciendo en las muestras obtenidas a los 10 minutos de R (**Figura 40 D**). Coincidentemente, la muerte de las células por apoptosis evaluada por la relación Bax/Bcl2 y el número de núcleos TUNEL positivos estuvo también incrementada en los ratones S2814D, como se observa en la **Figura 40 E, F y G**.

Analizados en conjunto, los resultados obtenidos en los experimentos realizados con los ratones transgénicos S2814A y S2814D muestran que la fosforilación dependiente de CaMKII en el residuo S2814 del RyR2 es un evento crucial en la señalización celular que determina el daño cardiaco resultante de la I/R.

Con el fin de descartar que los resultados obtenidos en los ratones con mutaciones en el RyR2 fueran debidos a un diferente nivel de activación de CaMKII en las distintas cepas, se evaluó en ellas, la autofosforilación de la quinasa en el sitio T287 (autoactivación) y la fosforilación de su sustrato, T17 de PLN.

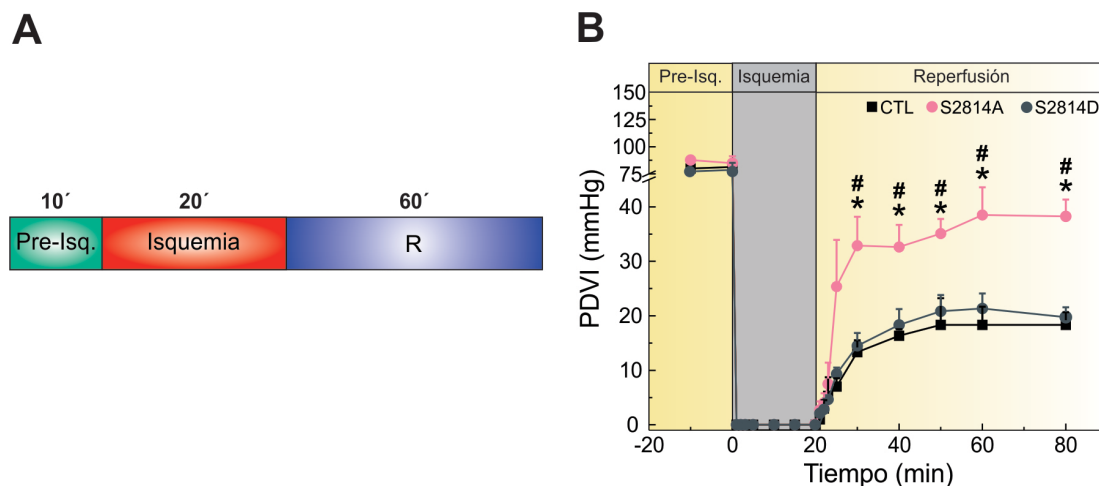
En la **Figura 41** se puede observar que las tres cepas presentaron un nivel similar de autofosforilación de CaMKII y del sitio T17 de PLN, a los 3 minutos de reperfusión. Esto confirma que las diferencias observadas entre ratones Ser2814A, Ser2814D y CTL, no pueden ser explicadas, por cambios en la activación de la CaMKII ni por mayor o menor actividad de la SERCA2a.



**Figura 41. Actividad de CaMKII en las diferentes cepas.** (A) Esquema del protocolo experimental: las flechas indican los momentos en los cuales fueron congelados los corazones. (B) Western Blots representativos de la fosforilación de T17 de PLN, PLN total y de la autofosforilación de CaMKII en preisquemia (Pre-Isq.) y a los 3 minutos de reperusión. (C y D) Resultados promedio de estos experimentos. Los datos representan la media  $\pm$  ES de  $n = 3-8$  corazones por grupo. \*  $P < 0,05$  vs. Pre-Isq.

Ante la posibilidad de que isquemias y/o reperfusiones tan prolongadas, pudieran provocar un deterioro contráctil tal, que nos impidiera evidenciar mayores diferencias mecánicas entre los grupos, se realizó una nueva serie de experimentos a tiempos de I/R más cortos.

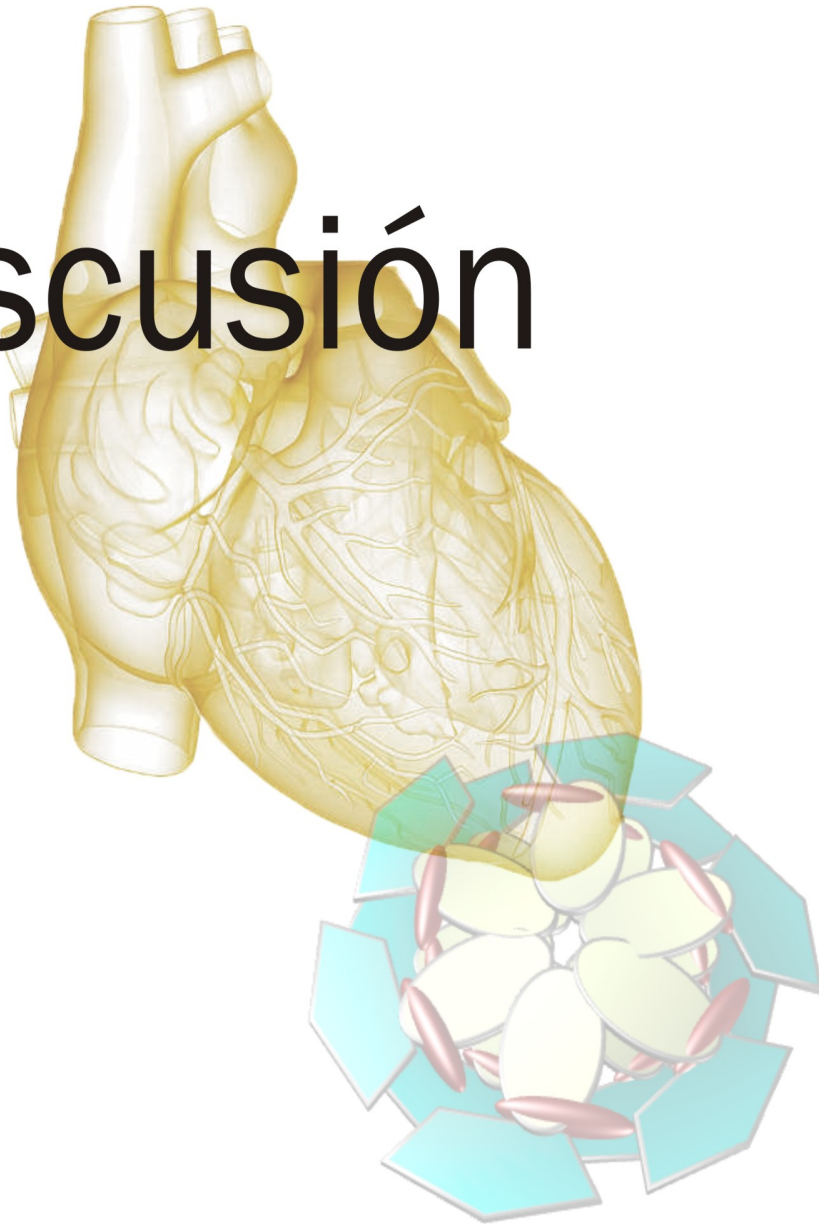
Corazones aislados de ratones CTL, S2814A y S2814D fueron sometidos a un protocolo de 20 minutos de isquemia seguidos de 60 minutos de reperusión evaluándose la recuperación mecánica post-isquémica. En la **Figura 42** se observa que el patrón de recuperación contráctil en las cepas estudiadas, es análogo al observado tras 45 minutos de isquemia y 120 minutos de R. Comparado con los corazones de ratones controles, la recuperación contráctil de la PDVI es similar en los S2814D y significativamente mayor en los S2814A.



**Figura 42. Recuperación mecánica en corazones sometidos a 20 minutos de isquemia y 60 min de reperusión.** (A) Esquema del protocolo experimental usado. (B) Transcurso en el tiempo de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI), en ratones CTL, S2814D y S2814A. Los datos representan la media  $\pm$  ES de  $n = 3-6$  por grupo. \* $P < 0,05$  vs. CTL. # $P < 0,05$  vs. S2814D.

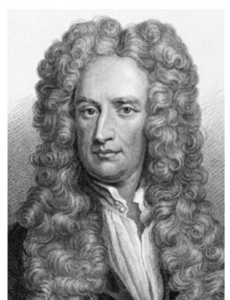
Los resultados de este trabajo de tesis muestran por primera vez que la fosforilación de S2814 de RyR2 juega un papel preponderante en el efecto perjudicial resultante de la activación de la CaMKII en el contexto de la injuria irreversible por I/R. Se demuestra además que la fosforilación de PLN dependiente de CaMKII no participa de los efectos adversos de la I/R, sino que por el contrario se opone a ellos.

# Discusión



*«Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano».*

**Isaac Newton (1642-1727)**



## Breve resumen de los resultados presentados

Los resultados de este trabajo de Tesis muestran que, la activación de la CaMKII durante la injuria irreversible por I/R, ejerce sus efectos deletéreos a través de la fosforilación del sitio S2814 del RyR2. La imposibilidad de fosforilación en este sitio (ratones S2814A) se asoció a una reducción en la extensión de la necrosis, en el número de núcleos apoptóticos y a una mejor recuperación contráctil respecto a los controles.

La fosforilación del sitio T17 de PLN parece representar un mecanismo protector frente a la injuria por I/R oponiéndose a los efectos deletéreos producidos por la activación de la CaMKII. La falta de la fosforilación de PLN en los ratones PLNDM sometidos a I/R, resultó en una sobrevida significativamente menor del tejido miocárdico.

## Elección del protocolo de I/R empleado en los experimentos

El preparado de corazón aislado y perfundido por la técnica de Langendorff es una herramienta experimental de valor indiscutible para el estudio del metabolismo, la reactividad vascular y las terapias farmacológicas en el corazón. Con el advenimiento de la era genómica, esta preparación ha ganado importancia como herramienta de investigación *ex-vivo*, para estudiar el impacto de la modificación genética en el corazón intacto. Probablemente, esta preparación seguirá siendo relevante en el futuro como puente entre los ensayos *in-vitro* e *in-vivo* [Laio R, 2012].

El protocolo empleado para la mayor parte de los experimentos de este trabajo (I45min/R120min) estuvo fundamentado en evidencias experimentales previas de nuestro laboratorio que demostraron la activación de CaMKII a esos tiempos [Villa Petroff M, 2007] estableciendo además un nexo entre esta enzima, sus fosforilaciones en el RS y el efecto deletéreo resultante de la I/R [Salas MA,



2010]. El presente trabajo es una continuación de esa línea de investigación por lo cual decidimos completar el estudio utilizando el mismo protocolo.

Aunque los tiempos de I/R empleados implicaron un importante deterioro contráctil durante la reperfusión, esto no fue un impedimento para detectar las diferencias entre los distintos grupos experimentales. Más aún, estas pudieron ser reproducidas aplicando protocolos con menores tiempos de isquemia y reperfusión (**Figura 42**). Varios autores han usado protocolos idénticos [Qian J, 2009] o similares [Martínez Demaría DR, 2003; Lam CK, 2013] a los empleados en este trabajo de Tesis.

A pesar de las diferencias existentes entre una isquemia global, como la que se utilizó en nuestro protocolo y una regional como suele ser la isquemia que se presenta frecuentemente en la clínica, el tiempo elegido es compatible con una situación médica real. Datos del Registro Nacional de Infarto del Miocardio (NRMI) de Estados Unidos señalan que solamente el 20% de los pacientes acude al hospital dentro de la hora de inicio de los síntomas [Weaver WD, 1992]. Datos similares han sido publicados recientemente en España [Alconero-Camarero AR, 2013].

## **La activación de CaMKII y sus consecuencias en el contexto de la injuria por I/R**

Modelos animales de I/R cardíaca como el desarrollado en la presente Tesis, han mostrado directa o indirectamente la activación de la CaMKII en respuesta a la isquemia seguida de reperfusión. Dicha activación, medida a través de la fosforilación de T17 se produjo tanto en protocolos de I/R capaces de provocar atontamiento miocárdico [Vittone L, 2002, Said M, 2003] como en aquellos que llevaban a la muerte celular [Villa Petroff M, 2007; Salas MA, 2010; Di Carlo, 2014]. Como fue ya explicado, la activación de CaMKII, se produce al inicio de la reperfusión por el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico debido al NCX actuando en su modo reverso ya que puede ser anulada reperfundiendo con O

Ca<sup>2+</sup> mas EGTA o con el bloqueante del modo reverso del NCX, KBR-7943 [Vittone L, 2002; Salas MA, 2010].

En esta Tesis, la activación de la quinasa se detectó no solo través de su sustrato pT17 sino también por la autofosforilación de la misma en el sitio T287.

En coincidencia con nuestros resultados, otros investigadores empleando un modelo murino de isquemia regional *in-vivo*, observaron un aumento de la actividad de CaMKII y/o de la fosforilación de sus sustratos a tiempos tempranos de reperfusión pero, en contradicción con nuestros hallazgos, los valores permanecieron elevados hasta los 120 min de reperfusión. Es posible que en este preparado, los mecanismos neurohumorales (catecolaminas, angiotensina II, etc) puedan haber contribuido al sostenimiento de dichas fosforilaciones [Ling H, 2013].

Por otro lado, en un trabajo recientemente publicado utilizando un modelo de isquemia global (I30/R40) se observó una disminución de los niveles de la forma autofosforilada (T287-CaMKII) y de la oxidada (Ox-CaMKII) respecto al grupo control no isquémico, en la reperfusión tardía [Rajtik T, 2016]. La cinética de activación de CaMKII por fosforilación ya había sido demostrada por nuestro grupo (Salas y col, 2010) y estos hallazgos sugieren que la activación de CaMKII por oxidación sigue el mismo patrón.

A pesar de que la mayor parte de las investigaciones sobre el tema, muestran que la CaMKII está involucrada en el contexto de la injuria por I/R, los resultados informados son diversos. Esta discordancia se debe entre otras razones, a que la quinasa ejerce un rol dual, beneficioso o detrimental dependiendo de la duración de la isquemia y de la reperfusión.

La activación de CaMKII en la injuria por I/R reversible tiene un efecto beneficioso sobre la función contráctil que ha sido atribuido a la mejora en el manejo del Ca<sup>2+</sup> intracelular debida a la fosforilación de T17 de PLN [Said, 2003]. Por otro lado, varios trabajos indican que durante la injuria por I/R irreversible la activación de CaMKII favorece el daño miocárdico. Este efecto ha sido confirmado por experimentos de I/R utilizando un inhibidor de la enzima como el KN-93 que

muestran una mayor viabilidad celular y mejoramiento de la función contráctil [Zhang R et al., 2005; Vila-Petroff et al., 2007; Salas et al., 2010; Rajtik T, 2016].

Sin embargo, recientemente Weinreuter y col, utilizando ratones transgénicos knock-out para CaMKII $\delta$  sometidos a un protocolo de I/R in-vivo (1 h I/24 hs R) no encontró diferencias significativas con los ratones controles en cuanto al tamaño de infarto, la liberación de LDH y el recuento de núcleos apoptóticos. Los autores concluyeron que CaMKII $\delta$  no desempeña ningún papel en el daño miocárdico agudo aunque señalan que al examinar los corazones a las 5 semanas de realizada la I/R fue evidente, en los ratones transgénicos, una reducción en el remodelamiento adverso post-infarto [Weinreuter M, 2014]. Una posible explicación para la discrepancia con los resultados aquí presentados y con los de otros grupos, es la utilización de un protocolo diferente de I/R aunque podría influir también el perfil genético de las cepas utilizadas [Reichelt ME 2009; Barnabei MS, 2010]

Recientemente se ha descrito una nueva vía que confirma la acción deletérea de CaMKII. En este trabajo, experimentos de I/R *in-vivo* evidenciaron la activación de CaMKII por RIP-3, una proteína quinasa cuya expresión se ha asociado a muerte celular [Sun X, 1999]. La activación de CaMKII se produce por fosforilación directa llevada a cabo por RIP-3 en el sitio T287 y por oxidación debida al incremento en la producción de ROS. Los autores sugieren que CaMKII sería la mediadora del daño miocárdico atribuido a RIP-3. [Zhang T, 2016].

### **Participación del RS en el efecto deletéreo de la activación de CaMKII**

La participación del RS en la injuria por I/R había sido previamente demostrada. El uso de herramientas farmacológicas, como el bloqueo de SERCA2a con tapsigarguina o del RyR2 con el alcaloide rianodina, logró reducir el infarto y la apoptosis en corazones de rata perfundidos *ex-vivo* y sometidos al mismo protocolo presentado en este trabajo [Salas MA, 2010]. Idéntico

tratamiento aplicado a miocitos bajo isquemia simulada y reoxigenación, mostró resultados similares [Villa Petroff M, 2007].

Los experimentos que mostramos aquí, en ratones SR-AIP en los cuales las fosforilaciones de CaMKII a nivel del RS están genéticamente inhibidas mostraron, una resistencia mayor al efecto deletéreo de la I/R.

Una posible limitación a tener en cuenta en esta cepa es que los SR-AIP presentan una inhibición de la facilitación de la corriente de  $Ca^{2+}$  a través de los LTCC, normalmente mediada por CaMKII, [Picht E, 2007] lo que podría inducirnos a sobrevalorar la participación del RS en la cardioprotección observada. No obstante, esta característica funcional no contradice lo expresado respecto al modo de activación de CaMKII ya que, se ha comprobado que el bloqueo de estos canales con nifedipina no afecta los niveles de activación de la enzima [Salas MA, 2010].

Es posible, sin embargo, que este efecto sobre los LTCC, adicionado a la falta de fosforilación de PLN y RyR2 por CaMKII pudiera afectar el nivel de carga del RS en condiciones basales. La ausencia de diferencias significativas en la contractilidad basal respecto al grupo control no avala esa hipótesis. Más aún, el estudio del contenido de  $Ca^{2+}$  en miocitos aislados, evaluado a través de un pulso de cafeína, a distintas frecuencias de estimulación, si bien mostró una tendencia a disminuir en los SR-AIP respecto a los CTL (a frecuencias altas), la carga de  $Ca^{2+}$  del RS nunca fue significativamente diferente [Picht E, 2007].

No podemos descartar que en los SR-AIP, el menor ingreso de  $Ca^{2+}$  cause una alteración en los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico durante el inicio de la reperfusión. Experimentos que permitan la medición de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma y el RS en el corazón entero por técnicas como la microscopía de fluorescencia serían necesarios para echar luz sobre esta cuestión. A pesar de ello, como se verá más adelante no necesariamente una baja carga del RS implica protección frente a la injuria por I/R. Así, los ratones S2814D a pesar de tener un RS con menor carga de  $Ca^{2+}$  evidencian una susceptibilidad aumentada a la muerte celular por I/R (Di Carlo MN, 2014).

## **Expresión y fosforilación de las proteínas del RS blanco de CaMKII**

El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico es un evento crucial en el daño por I/R. El nivel intracelular de este ion depende fundamentalmente del balance entre la retoma de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el RS por la SERCA2a y su liberación por el RyR2. Considerando que CaMKII fosforila tanto T17 de PLN, modulando la actividad de SERCA2A como el residuo S2814 del RyR2 influenciando la función de este canal, era factible que el efecto deletéreo descrito estuviera relacionado al accionar de alguno de estos sustratos.

Analizados los niveles de expresión de las proteínas blanco de CaMKII en el RS observamos que PLN no presentaba variaciones significativas durante el protocolo, Sin embargo, la expresión de RyR2 se redujo significativamente a los tiempos de reperfusión investigados. Estos hallazgos coinciden con resultados previos de nuestro y otros laboratorios [Salas, MA, 2010; Pedrozo Z, 2010]. La disminución en la expresión del RyR2, podría deberse a la activación de una vía proteolítica dependiente de las calpaínas y del proteosoma activadas en I/R, [Pedrozo Z, 2010]. Algunos autores proponen que este descenso en la expresión podría cumplir un rol cardioprotector ya que la reducción del RyR2 a través de un ARN de interferencia (siARN) mostró un incremento en la supervivencia de cardiomiocitos sometidos a I/R simulada [Guo Z, 2010].

### **La fosforilación del sitio T17 de PLN por CaMKII brinda cardioprotección frente a la injuria por I/R**

En los experimentos realizados en ratones PLNDM, impedir la fosforilación de T17 dependiente de CaMKII al inicio de la reperfusión, incrementó significativamente el tamaño del infarto y produjo un marcado deterioro contráctil. Sorpresivamente no hubo diferencias significativas en el grado de apoptosis entre los ratones transgénicos y sus CTL. Creemos como una posible explicación para estos hallazgos, los altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en estos ratones al inicio de la

reperfusión [Valverde CA, 2006]. Como ha sido señalado en la introducción, esto podría derivar en dos importantes consecuencias: en primer lugar una mayor actividad de las calpaínas [Inserte J, 2012] con lesión del citoesqueleto y por lo tanto propensión a la ruptura del sarcolema en la reperfusión y en segundo lugar, a nivel mitocondrial: una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y apertura del poro de transición (mPTP), con pérdida del potencial de membrana mitocondrial, deterioro en la síntesis de ATP, producción de ROS y necrosis [Abdallah Y, 2011]. Como la apoptosis es un proceso que requiere integridad de la membrana plasmática y mínimos niveles de ATP, la muerte por necrosis podría explicar los infartos más extensos presentes en los ratones PLNDM. De hecho la injuria persistente puede convertir a la muerte celular apoptótica en una necrótica, lo que se conoce como necrosis secundaria [Slater AF, 1995].

Como fue descrito, los ratones PLDM también presentan un mecanismo compensador relacionado con el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular: un aumento de aproximadamente el 20% en la corriente de los canales LTCC. Se ha demostrado que el aumento de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales por sobreexpresión de la subunidad  $\beta$  se asocia a menor viabilidad celular y muerte por apoptosis [Chen X, 2005] o a necrosis y cardiomiopatía [Nakayama H, 2007] dependiendo de la especie utilizada. En nuestros experimentos descartamos que este mecanismo compensador pudiera estar condicionando las conclusiones obtenidas. La utilización de una dosis de nifedipina capaz de anular el incremento en la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en los ratones PLNDM, no logró revertir el importante infarto que presentaban al final de la I/R. Tampoco redujo la liberación de LDH, ni mejoró la recuperación contráctil. Nuestros resultados dan así sustento experimental a la hipótesis de que la fosforilación de PLN por CaMKII tiene un efecto beneficioso en el contexto de la injuria por I/R.

Sin embargo, el papel que cumple la fosforilación de PLN en la I/R despierta controversias y se han publicado resultados contradictorios. Parte de la discusión se basa en atribuirle un efecto beneficioso o perjudicial al aumento en la retoma de  $\text{Ca}^{2+}$  que implica la fosforilación de PLN.

Por un lado, se sostiene que, como la fosforilación de PLN incrementa la retoma de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del RS, esto contribuye a disminuir la elevación citoplasmática de este ion característica de los primeros minutos de reperfusión [Valverde Ca, 2006]. Se evita de este modo la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial [Hausenloy DJ, 2012] y se favorece la recuperación contráctil. Nuestros resultados están en coincidencia con este argumento.

Otros autores por el contrario, afirman que el incremento en la retoma de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de SERCA2a, aumentaría la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, conduciendo a la aparición de pérdidas diastólicas espontáneas ( $\text{Ca}^{2+}$  leak) mediante el mecanismo denominado SOICR (store overload-induced calcium release), sobrecargando al citosol y agravando la injuria por I/R [Chen W, 2014]. Apoyando esta última afirmación Yang y col demostraron que los ratones AC3-I que expresan en forma transgénica el péptido inhibidor de la CaMKII, AIP, presentaban menor incidencia de apoptosis luego de un IAM que sus controles (AC3-C) [Yang Y, 2006]. Pero ese efecto se perdía cuando los AC3-I eran cruzados con ratones carentes de PLN (PLN-KO). La falta de fosforilación de PLN en los AC3-I deriva en una menor carga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. Al cruzarlos con los PLNKO aumenta la actividad de la SERCA2a, la carga se normaliza y la apoptosis se incrementa.

En favor del rol deletéreo cumplido por la fosforilación de PLN en IR se suma la descripción del efecto cardioprotector ejercido por el complejo HAX-1/hsp90 a través de potenciar la inhibición de PLN sobre la SERCA2a evitando así la sobrecarga del RS [Lam CK, 2013].

A pesar de lo expuesto, atribuirle un rol perjudicial a la fosforilación de PLN va en contra de los mecanismos de cardioprotección propuestos por múltiples estrategias terapéuticas que han llegado a la fase de estudios clínicos en humanos, en las cuales se sugiere la participación de PLN en el efecto beneficioso [Abdallah Y, 2006; García-Dorado D, 2014].

Cabe mencionar que se ha descripto también, desfosforilación de PLN durante la isquemia a través de una vía iniciada por activación de calcineurina que lleva a un mayor deterioro estructural [Shintani-Ishida K, 2011]. Esto determinaría sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la reperfusión y como consecuencia



muerte celular. A pesar de que este mecanismo es diferente al que hemos propuesto podemos destacar la coincidencia en el hecho de que la reducción en los niveles de fosforilación de PLN se asocia a un resultado más sombrío tras la I/R.

### **La fosforilación del sitio S2814 del RyR2 por CaMKII es la responsable de los efectos perjudiciales durante la I/R**

En este trabajo demostramos que durante los primeros minutos de la reperfusión, el RyR2 es fosforilado por CaMKII en el residuo 2814 y que prevenir esta fosforilación (ratones S2814A) reduce el daño irreversible asociado a la I/R (necrosis y apoptosis) y la disfunción contráctil (**Figura 39**).

Los resultados anteriores se vieron fortalecidos por los experimentos realizados en los ratones con pseudofosforilación constitutiva de ese mismo residuo (S2814D), en los cuales se evidenció una mayor susceptibilidad al daño miocárdico post-isquémico, (**Figura 40**). A pesar de que el tamaño del infarto fue significativamente mayor en esta cepa, la recuperación mecánica fue semejante a la del grupo CTL. Dos explicaciones son posibles para este hallazgo: 1) estos ratones poseen una menor carga de  $Ca^{2+}$  en el RS causada por una mayor pérdida diastólica [van Oort RJ, 2010] y a pesar de ello, mantienen un transitorio normal. Esto se explica porque poseen una mayor liberación fraccional de  $Ca^{2+}$  medida como la relación entre la amplitud del transitorio de  $Ca^{2+}$  y de la liberación inducida por cafeína. Este fenómeno sugiere que la fosforilación del sitio 2814 incrementa la activación del RyR2 tanto en sístole como en diástole [van Oort RJ, 2010] y 2) Varios trabajos muestran que, dependiendo de los tiempos de I/R utilizados, no siempre existe una buena correlación entre la actividad mecánica y el tamaño del infarto. La depresión contráctil después de un período de isquemia prolongado se debe no solo a la pérdida de tejido viable, sino también a la existencia de áreas de miocardio aturdido (stunning) en las zonas peri-infarto, las cuales pueden llegar con el tiempo a recuperar su función normal una vez

reperfundidos (Williamson BD, 1990). Se requerirían tiempos de reperfusión más prolongados, para definir la recuperación contráctil definitiva. [Lochner A, 2003; Minicucci MF, 2014].

Los ratones S2814D presentaron en la preisquemia una liberación de LDH significativamente mayor que la del grupo CTL. Tanto en los ratones transgénicos como en los controles se produjo un aumento significativo de LDH en los primeros minutos de reperfusión, pero ese incremento desapareció en los ratones S2814D transcurridos 10 minutos. Esto sugiere que en ellos el proceso de necrosis fue intenso y concentrado en los primeros minutos del restablecimiento del flujo. Basados en los efectos funcionales descritos de la fosforilación del RyR2 por la CaMKII en otras situaciones [Said M, 2008; Respress JL, 2012], es posible que la fosforilación constitutiva del canal, al producir un aumento de la fuga de  $Ca^{2+}$  en diástole pueda favorecer la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  mitocondrial y consecuentemente el daño miocárdico por apoptosis y necrosis aún en condiciones basales o de mínimo estrés como puede ser el aislamiento del corazón [Chen X, 2005].

### **El papel de la apoptosis en la injuria por I/R**

Aún es motivo de discusión en la bibliografía, la contribución que tienen los principales mecanismos de muerte celular, necrosis y apoptosis al área total del infarto. Si bien la necrosis se considera el principal contribuyente [McCully JD, 2004], la presencia de apoptosis ha sido demostrada en la zona central [Kajstura J, 1996], periférica y remota del infarto [Olivetti G 1996, Palojoki E, 2001]. Dependiendo del protocolo de I/R utilizado y de los inhibidores de caspasas empleados, se han informado valores de apoptosis que varían entre ~ 7% y 14% del área total del infarto correspondiendo el resto a necrosis [Yaoita H, 1998; McCully JD, 2004]. Este proceso puede involucrar tanto a células miocíticas como no miocíticas (endoteliales, fibroblastos, macrófagos, etc) [Frangogiannis NG, 2008].

La importancia de la apoptosis como proceso de muerte en la injuria por I/R no es universalmente aceptada. Algunos autores han sugerido que en el miocito adulto se produce el silenciamiento de genes clave de la apoptosis como por ejemplo APAF-1 [Sanchis D, 2003], bloqueando así la vía mitocondrial, a pesar de la liberación del citocromo c al citosol. Se argumenta que esta resistencia a la apoptosis podría constituir un mecanismo que favorezca la supervivencia de aquellas células con diferenciación terminal y períodos de vida prolongados, incluso ante estímulos potencialmente letales [Sanchis D, 2008].

Los experimentos presentados en este trabajo de Tesis revelan que la apoptosis está presente durante la injuria por I/R y que, estrategias que modulan las fosforilaciones dependientes de CaMKII en el RS, pueden determinar un incremento o disminución en sus niveles.

Nuestros experimentos mostraron valores de apoptosis dentro del rango informado en la literatura [Yaoita H, 1998; Crow MT, 2004].

Intervenciones específicas sobre la vía de apoptosis, han mostrado efecto cardioprotector reduciendo el área de infarto. Chen Z, y col. sobreexpresando la proteína antiapoptótica Bcl-2, logró una reducción significativa del tamaño de infarto (~ 50%) [Chen Z, 2001]. Similar efecto sobre el área de infarto y el grado de apoptosis se logró con la administración de un inhibidor general de caspasas (ZVAD-fmk) [Yaoita H, 1998]. Es decir que, estrategias cardioprotectoras que actúan a nivel mitocondrial, reducen la apoptosis y también la necrosis. Nuestros resultados son coincidentes con estas observaciones y proponen un comienzo de la cascada apoptótica en el RS por acción de la CaMKII [Salas MA, 2010].

En los infartos regionales que ocurren en el contexto clínico, también ha sido detectada la presencia de apoptosis en áreas alejadas del mismo [Olivetti G, 1996]. La apoptosis tiene por lo tanto transcendencia en la clínica en cuanto a que participa en el remodelamiento ventricular adverso que sigue al evento isquémico, especialmente en un infarto de miocardio extenso [Kim NH, 2010].

## CONCLUSIÓN FINAL

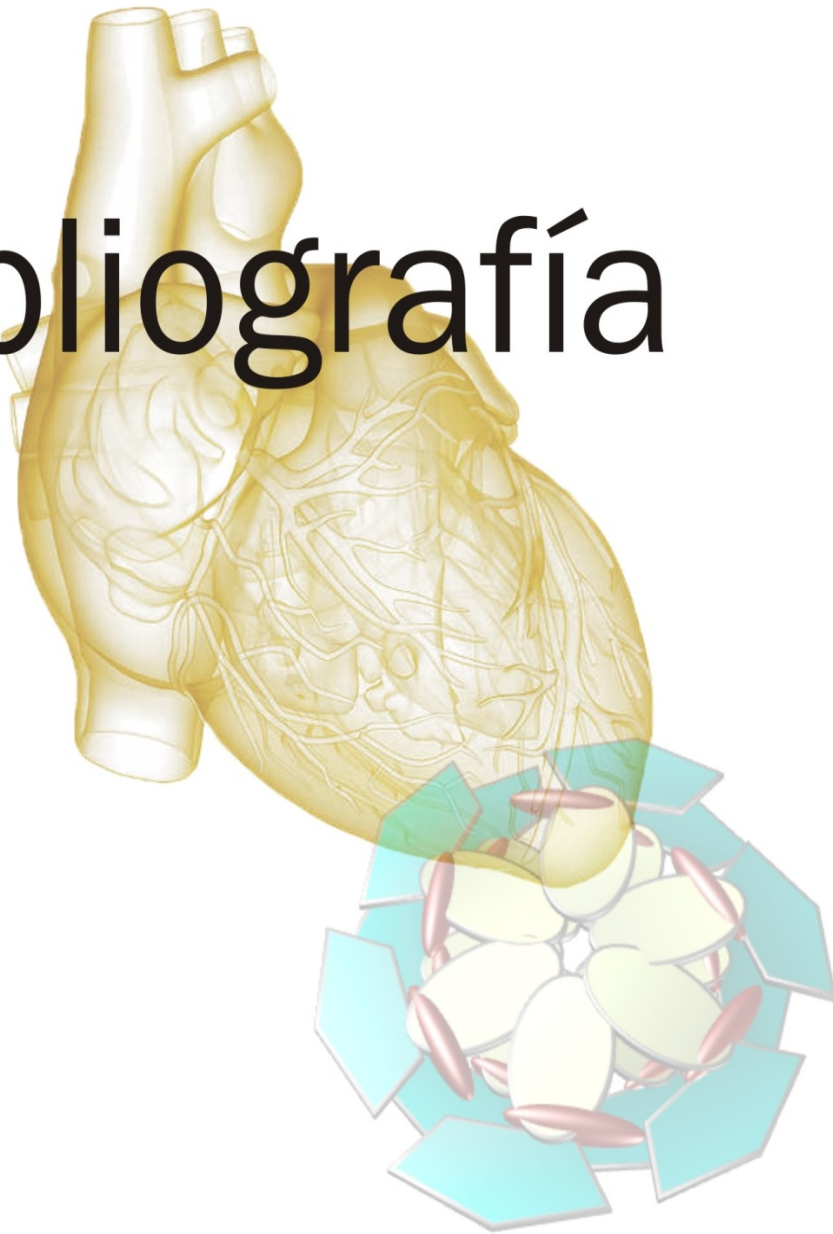
En resumen, este trabajo de Tesis demuestra por primera vez que la fosforilación del sitio S2814 del RyR2 es un acontecimiento clave en la cascada de eventos iniciados por la activación de CaMKII en el contexto de la injuria irreversible por I/R. Nuestros resultados indican que la inhibición de la fosforilación del RyR2 por CaMKII es necesaria y suficiente para minimizar el daño cardíaco. La fosforilación de PLN dependiente de CaMKII por el contrario, no contribuye a la lesión, sino más bien se opone a ella.

Estudios como el realizado en esta Tesis Doctoral ayudarán a conocer mejor los mecanismos subcelulares que conducen al infarto de miocardio, paso indispensable para plantear un tratamiento eficaz. Sin duda, además del conocimiento de la patología, se necesitan políticas sanitarias estratégicas tendientes a reducir los factores de riesgo, disminuyendo así, la alta incidencia de esta entidad fisiopatológica, al día de hoy, primera causa de muerte en Argentina.

### Perspectivas futuras

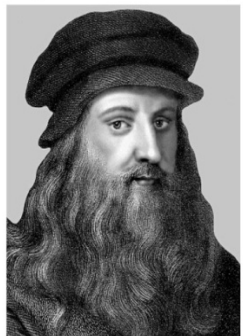
Los resultados obtenidos en esta Tesis, abren nuevos interrogantes que esperamos sean aclarados en futuros experimentos. Sería importante dilucidar en qué grado, la activación de CaMKII al inicio de la reperfusión favoreciendo la pérdida de  $Ca^{2+}$  desde el RS, depleciona este reservorio. En ese contexto, las condiciones de trabajo del retículo endoplasmático encargado de realizar el correcto plegamiento de las proteínas, serían desfavorables. Se ha descrito que, la acumulación de polipéptidos mal plegados, inicia una señalización celular denominada estrés del RE, intentando rescatar de la apoptosis, a las células afectadas. Caracterizar la producción de estrés del RE en nuestro modelo experimental y determinar si CaMKII participa en su modulación son los objetivos que orientarán nuestros próximos experimentos.

# Bibliografía



*«La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable».*

**Leonardo Da Vinci (1452-1519)**



**Abdallah Y**, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter KD, Schäfer M, Piper HM, Schäfer C. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca<sup>2+</sup> storage. *Cardiovasc Res*. 2006;70(2):346-53.

**Abdallah Y**, Kasseckert SA, Iraqi W, Said M, Shahzad T, Erdogan A, Neuhof C, Gündüz D, Schlüter KD, Tillmanns H, Piper HM, Reusch HP, Ladilov Y. Interplay between Ca<sup>2+</sup> cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. *J Cell Mol Med*. 2011;15(11):2478-85.

**Acehan D**, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 2002;9(2):423-32.

**AielloEA**, Cingolani HE. Angiotensin II stimulates cardiac L-type Ca<sup>(2+)</sup> current by a Ca<sup>(2+)</sup>- and protein kinase C-dependent mechanism. *Am J Physiol*. 2001;280:H1528-36.

**Alconero-CamareroAR**, Muñoz-Cachoa P, Revuelta JM. Tiempos de demora de atención sanitaria en el infarto agudo de miocardio: diferencias por sexos. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:64-5.

**Allín JG, Rolandi F**, Herrera Paz JJ, Maurice MF, Grinfeld L, Iglesias R. Evolución del tratamiento del infarto agudo de miocardio en la Argentina desde 1987 a 2005. *MEDICINA (Buenos Aires)* 2010; 70: 15-22.

**Anderson ME**. Multiple downstream proarrhythmic targets for calmodulin kinase II: Moving beyond an ion channel-centric focus. *Cardiovasc Res*. 2007;73:657-66.

**Backx PH**. Complexity, confusion and controversy continue complicating the contribution of RyR2 channel phosphorylation to heart function. *J Physiol*. 2014;592(9):1911-2.

**Baines CP**. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia reperfusion Injury. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(2): 181-8.

**Baker DL**, Hashimoto K, Grupp IL, Ji Y, Reed T, Loukianov E, Grupp G, Bhagwat A, Hoit B, Walsh R, et al. Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. *Circ Res*. 1998;83:1205-14.

**Barnabei MS**, Palpant NJ, Metzger JM. Influence of genetic background on ex vivo and in vivo cardiac function in several commonly used inbred mouse strains. *Physiological Genomics*. 2010;42A(2):103-13.

**Bel MS**, Soldevila JG, Ordóñez Llanosc J. Marcadores biológicos de necrosis miocárdica. *Rev Esp Cardiol*. 2003;56:703-20.

**Bernal DR**, Baltaxe E, Pascual G A. La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado perfundido. *Universitas Medica* 2004;45(3):111-117.

**Bernstein J**. Ueber den zeitlichen Verlauf der negativen Schwankung des Nervenstroms. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 1868;1(1):173-207.

**Bernstein J**. Untersuchungen ueber den Erregungsvorgang im Nerven- und Muskel-systeme. (1871).

**Bers DM**. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205.

**Bers DM**. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force.(2 nd Ed).Kluwer Academic Publishers; 2001.

**Bers DM**. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(2):417-29.

**Best JM** and Kampa TJ. Different Subcellular Populations of L-type Ca<sup>2+</sup> Channels Exhibit Unique Regulation and Functional Roles in Cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(2):376–87.

**Bezanilla F.** Voltage sensor movements. *J Gen Physiol.* 2002; 120(4):465–473.

**Blanco P,** Borracci RA., Giorgi M, Higa C, Botto F, Gagliardi, J. Años de vida perdidos por infarto agudo de miocardio en la Argentina entre 1991 y 2005. 2008. *Revista argentina de cardiología* 2008;76(6), 442-449.

**Bonow RO,** Mann DL, Zipes DP, Libby P. Braunwald Tratado de Cardiología. 9na Ed. Barcelona, España. Elsevier; 2013.

**Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

**Braun AP,** Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* 1995;57:417– 45.

**Braunwald E,** Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword?. *J Clin Invest.* 1985;76(5): 1713–9.

**Braunwald E,** Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 1982;66(6):1146-9.

**Bretón-Romero R,** Lamas S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biol.* 2014;2:529-34.

**Brette F,** Salle L, Orchard CH. Differential modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> current by SR Ca<sup>2+</sup> release at the T-tubules and surface membrane of rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 2004;95: 1–7.

**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(16):12129-35.

**Brittsan AG,** Ginsburg KS, Chu G, Yatani A, Wolska BM, Schmidt AG, Asahi M, MacLennan DH, Bers DM, Kranias EG. Chronic SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibition causes adaptive changes in cellular Ca<sup>2+</sup> transport. *Circ Res.* 2003 Apr 18;92(7):769-76.

**Broughton BR,** Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke.* 2009;40(5):e331-9.

**Buja LM.** The Pathobiology of Acute Coronary Syndromes. *Tex Heart Inst J.* 2013; 40(3): 221–8.

**Camors E,** Valdivia HH. CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol.* 2014;5: 101.

**Campbell KP,** Leung AT, Sharp AH. T. The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci.* 1988;11(10):425-430.

**Cantilina T,** Sagara Y, Inesi G, Jones LR. Comparative studies of cardiac and skeletal sarcoplasmic reticulum ATPases. Effect of a phospholamban antibody on enzyme activation by Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem.* 1993;268(23):17018–17025.

**Catterall WA.** Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:521–55.



- Chao LH**, Pellicena P, Deindl S, Barclay LA, Schulman H, Kuriyan J. Intersubunit capture of regulatory segments is a component of cooperative CaMKII activation. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(3):264-72.
- Chelu MG**, Sarma S, Sood S, Wang S, van Oort RJ, Skapura DG, et al. Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest* 2009;119:1940–51.
- Chen W**, Wang R, Chen B, Zhong X, Kong H, Bai Y, Zhou Q, Xie C, Zhang J, Guo A, et al. The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca<sup>2+</sup> waves and Ca<sup>2+</sup>-triggered arrhythmias. *Nat Med.* 2014;20(2):184-92.
- Chen X**, Zhang X, Kubo H, Harris DM, Mills GD, Moyer J, Berretta R, Potts ST, Marsh JD, Houser SR. Ca<sup>2+</sup> influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res.* 2005;97(10):1009-17.
- Chen Z**, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(5):H2313-20.
- Cheng H**, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* 1993;262(5134):740-4.
- Chu G**, Lester JW, Young KB, Luo W, Zhai J, Kranias EG. A single site (Ser16) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to B-agonists. *J Biol Chem* 2000;275:38938– 43.
- Clapham DE**. Calcium signaling. *Cell* 2007; 131: 1047–1058.
- Colomer JM**, Mao L, Rockman HA, Means AR. Pressure overload selectively up-regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol Endocrinol* 2003;17:183–92.
- Crow MT**, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res.* 2004;95(10):957-70.
- De Koninck P**, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science.* 1998;279(5348):227-30.
- Degterev A**, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005;1(2):112-9.
- Despa S**, Brette F, Orchard CH & Bers DM. Na/Ca exchange and Na/K-ATPase function are equally concentrated in transverse tubules of rat ventricular myocytes. *Biophys J* 2003;85:3388–3396.
- Deveraux QL**, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998;17(8):2215-23.
- Di Carlo MN**, Said M, Ling H, Valverde CA, De Giusti V, Sommesse L, Palomeque J, Aiello AE, Skapura DG, Rinaldi G, et al. Camkii-Dependent Phosphorylation of Cardiac Ryanodine Receptors Regulates Cell Death In Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2014;74:274-83.
- Dolphin AC**. A short history of voltage-gated calcium channels. *British Journal of Pharmacology.* 2006;147(Suppl 1):S56-S62.
- Donoso P**, Sánchez G. Redox regulation of sarcoplasmic reticulum Calcium cycling in the heart. *Physiological Mini Reviews* 2013;6(5):38-47.

- Dos Santos A**, Gurfinkelti E. Troponinas cardíacas en los síndromes coronarios agudos. *Rev Argente Cardiol* 1999(67):391-8.
- Drago GA**, Colyer J, Lederer WJ. Immunofluorescence localization of SERCA2a and the phosphorylated forms of phospholamban in intact rat cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;853:273-9.
- Drago GA**, Colyer J. Discrimination between two sites of phosphorylation on adjacent amino acids by phosphorylation site-specific antibodies to phospholamban. *J Biol Chem* 1994;269:25073-77.
- Earnshaw WC**, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424.
- Eghbali M**, Tomek R, Woods C, Bhambi B. Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci U|S|A.* 1991; 88:795-9.
- Elmore S**. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology.* 2007;35(4):495-516.
- Erickson JR**, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, et al. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell.* 2008;133(3):462-74.
- Erickson JR**. Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Frontiers in Pharmacology.* 2014;5:59.
- Fabiato A**. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1983;245(1):C1-14.
- Fang K**, Colecraft HM. Mechanism of auxiliary beta-subunit-mediated membrane targeting of L-type (Ca(V)1.2) channels. *J Physiol* 2011;589:4437-55.
- Fenton HJH**. The oxidation of tartaric acid in presence of iron *J. Chem. Soc., Trans.* 1894;65:899-910.
- Ferrantini C**, Crocini C, Coppini R, Vanzi F, Tesi C, Cerbai E, Poggesi C, Pavone FS, Sacconi L. The transverse-axial tubular system of cardiomyocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(24):4695-710.
- Ferrari R**, Censi S, Mastrorilli F, Boraso A. Prognostic benefits of heart rate reduction in cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* 2003;5:G10-G14.
- Fill M**, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* 2002;82(4):893-922.
- Fink SL**, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005;73(4):1907-16.
- Frangogiannis NG**. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008;58(2):88-111.
- Franzini-Armstrong C**, Porter KR. Sarcolemmal invaginations constituting the T system in fish muscle fibers. *J Cell Biol* 1964;22: 675-696.
- Fu Y**, Westenbroek RE, Yu FH, Clark JP 3rd, Marshall MR, Scheuer T, Catterall WA. Deletion of the distal C-terminus of Cav1.2 channel leads to loss of Beta-adrenergic regulation and heart failure in vivo. *J Biol Chem* 2011;286:12617-26.
- Gaertner TR**, Kolodziej SJ, Wang D, Kobayashi R, Koomen JM, Stoops JK, Waxham MN. Comparative analyses of the three-dimensional structures and enzymatic properties of alpha, beta, gamma and delta isoforms of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 2004;279: 12484-94.

**Galluzzi L**, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):107-20.

**Galvani LA**. De viribus electricitatis in motu musculari commentarius, Bonon. *Sci. Art. Inst. Acad. Comment.*, Bologna, 1791, 7, 363-418. (Bologna, 1791)

**Garcia-Dorado D**, Rodríguez-Sinovasa A, Ruiz-Meana M, Insetea J. Protección contra el daño miocárdico por isquemia-reperfusión en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol*. 2014;67(5):394-404.

**Garcia-Dorado D**, Ruiz-Meana M, Insete J, Rodríguez-Sinovasa A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2012;94(2):168-80.

**Garcia-Dorado D**, Thérout P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Muñoz R, Elizaga J, Botas J, Fernández-Avilés F, et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*. 1992;85(3):1160-74.

**George CH**. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure: mere observation or functional relevance? *Cardiovasc Res*. 2008;77:302-314.

**Gerdes AM**, Morales MC, Handa V, Moore JA, Alvarez MR. Nuclear size and DNA content in rat cardiac myocytes during growth, maturation and aging. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:833-9.

**Gimbrone MA Jr**, Garcia-Cardena G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 2013;22(1):9-15.

**Griffith LC**. Regulation of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Activation by Intramolecular and Intermolecular Interactions. *J Neurosci*. 2004;24(39):8394-8.

**Guo A**, Zhang C, Wei S, Chen B, Song LS. Emerging mechanisms of T-tubule remodeling in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2013;98(2):204-15.

**Guo Z**, Wang S, Jiao Q, Xu M, Gao F. RNAi targeting ryanodine receptor 2 protects rat cardiomyocytes from injury caused by simulated ischemia-reperfusion. *Biomed Pharmacother*. 2010;64(3):184-90.

**Gustafsson AB**, Gottlieb RA. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc Res* 2008(77):334-43.

**Gutierrez DA**, Fernández-Tenorio M, Ogradnik J, Niggli E. NO-dependent CaMKII activation during  $\beta$ -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc Res*. 2013;100(3):392-401.

**Halestrap AP**. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die, *Biochem. Soc. Trans*. 2006;34:232-7.

**Halling DB**, Parks PA, Hamilton SL. Regulation of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels by Calmodulin. *Sci STKE*. 2005;315:re15.

**Harvey RD**, Hell JW. CaV1.2 signaling complexes in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;58:143-52.

**Hasche ET**, Fernandes C, Freedman SB, Jeremy RW. Relation between ischemia time, infarct size, and left ventricular function in humans. *Circulation*. 1995;92(4):710-9.

**Hausenloy D**, Boston-Griffiths E, Yellon D. Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent. *British Journal of Pharmacology*. 2012;165(5):1235-45.

**Hearse DJ**, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol.* 1973;5(4):395-407.

**Hendrikx M**, Mubagwa K, Verdonck F, Overloop K, Van Hecke P, Vanstapel F, et al. New Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function and high-energy phosphate resynthesis and reduces Ca<sup>2+</sup> overload in isolated perfused rabbit heart. *Circulation.* 1994;89:2787-98.

**Heusch G**, Libby P, Gersh B, Yellon D, Böhm M, Lopaschuk G, Opie L. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet.* 2014;383(9932):1933-43.

**Hiess F**, Vallmitjana A, Wang R, Cheng H, ter Keurs HE, Chen J, Hove-Madsen L, Benitez R, Chen W. Distribution and Function of Cardiac Ryanodine Receptor Clusters in Live Ventricular Myocytes. *J Biol Chem.* 2015;290(33):20477-87.

**Hill AV**. The abrupt transition from rest to activity in muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1949;136(884):399-420.

**Hoch B**, Meyer R, Hetzer R, Krause E-G, Karczewski P. Identification and expression of  $\gamma$ -isoforms of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 1999;84:713- 21.

**Hoelz A**, Nairn AC, Kuriyan J. Crystal structure of a tetradecameric assembly of the association domain of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II. *Mol Cell.* 2003;11(5):1241-51.

**Horie Y**, Ishii H. Liver dysfunction elicited by gut ischemia-reperfusion. *Pathophysiology.* 2001; 8:11-20.

**Hudmon A**, Schulman H . Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem* 2002;71:473-510.

**Huggins JP**, Cook EA, Piggott JR, Mattinsley TJ, England PJ. Phospholamban is a good substrate for cyclic GMP-dependent protein kinase in vitro, but not in intact cardiac or smooth muscle. *Biochem. J.* 1989;260:829-35.

**Huke S**, Bers DM. Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376(1):80-5.

**Inserte J**, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Agulló L, Pina P, Soler-Soler J. Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc Res.* 2004;64(1):105-14.

**Inserte J**, Hernando V, Garcia-Dorado D. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2012;96(1):23-31.

**Inui M**, Saito A, Fleischer S. Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem.* 1987;262(32):15637-42.

**Ishida A**, Shigeri Y, Taniguchi T, Kameshita I. Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. *Pharmacol Ther* 2003;100:291- 305.

**Ji Y**, Li B, Reed TD, Lorenz JN, Kaetzel MA, Dedman JR. Targeted inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac longitudinal sarcoplasmic reticulum results in decreased phospholamban phosphorylation at threonine 17. *J Biol Chem.* 2003;278:25063-71.

**Jiang D**, Chen W, Wang R, Zhang L, Chen SR. Loss of luminal Ca<sup>2+</sup> activation in the cardiac ryanodine receptor is associated with ventricular fibrillation and sudden death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(46):18309-14.

**Jiang X**, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*. 2000;275(40):31199-203.

**Jin W**, Brown AT, Murphy AM. Cardiac myofilaments: from proteome to pathophysiology. *Proteomics Clin Appl*. 2008;2(6):800-10.

**Jouan-Lanhouet S**, Riquet F, Duprez L, Vanden Berghe T, Takahashi N, Vandenabeele P. Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;35:2-13.

**Joza N**, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001;410(6828):549-54.

**Jugdutt BI**. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix. When is enough enough? *Circulation* 2003;108: 1395-403.

**Kadambi VJ**, Ponniah S, Harrer J, Hoit B, Dorn GW, Walsh RA, Kranias EG. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1996;97:533-9.

**Kajstura J**, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. 1996;74(1):86-107.

**Kalogeris T**, Baines CP, Krenz M, KorthuisRJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317.

**Kanaseki T**, Ikeuchi Y, Sugiura H, Yamauchi T. Structural features of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II revealed by electron microscopy. *J Cell Biol* 1991;115:1049- 60.

**Katz AM**. Discovery of phospholamban. A personal history. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;853:9-19.

**Kim NH**, Kang PM. Apoptosis in cardiovascular diseases: mechanism and clinical implications. *Korean Circ J*. 2010;40(7):299-305.

**Kimura Y**, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH. Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. *J Biol Chem*. 1997;272(24):15061-4.

**Kimura Y**, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH. Phospholamban regulates the Ca<sup>2+</sup>-ATPase through intramembrane interactions. *J Biol Chem*. 1996;271:21726-31.

**Kleber AG**, Saffitz JE. Role of the intercalated disc in cardiac propagation and arrhythmogenesis. *Front Physiol*. 2014;5:404.

**Koyama T**, Tawa M, Yamagishi N, Tsubota A, Sawano T, Ohkita M, Matsumura Y. Role of superoxide production in post-ischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat hearts. *Eur J Pharmacol*. 2013;711(1-3):36-41.

**Krajewski S**, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*. 1993;53(19):4701-14.

- Kranias EG**, Hajjar RJ. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res.* 2012;110(12):1646-60.
- Kroemer G**, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2008;9(12):1004-10.
- Kühlbrandt W.** Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* 2015;13:89.
- Kung G**, Konstantinidis K, Kitsis RN. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart. *Circ Res.* 2011;108(8):1017-36.
- Kunitomo Y**, Terentyev D. How to stop the fire? Control of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in cardiac muscle. *The Journal of Physiology.* 2011;589(24):5899-900.
- 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(22):10274-9.
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
- Lam CK**, Zhao W, Cai W, et al. Novel Role of HAX-1 in Ischemic Injury Protection: Involvement of Hsp90. *Circulation research.* 2013;112(1):79-89.
- Lande G**, Demolombe, S, Bammert, A, Moorman, A, Charpentier, F, Escande, D. Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominantnegative isoform. Part II: pharmacological profile. *Cardiovasc. Res.* 2001;50:328-34.
- Liao R**, Podesser BK, Lim CC. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303(2):H156-67.
- Lima B**, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ. Res.* 2010;106:633-46.
- Ling H**, Gray CBB, Zambon AC, et al. CaMKII $\delta$  Mediates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Through NF- $\kappa$ B. *Circulation research.* 2013;112(6):935-44.
- Ling H**, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chen J, Bers D, Brown JH. Requirement for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(5):1230-40.
- Liu B**, Ho HT, Velez-Cortes F, Lou Q, Valdivia CR, Knollmann BC, Valdivia HH, Gyorko S. Genetic ablation of ryanodine receptor 2 phosphorylation at Ser-2808 aggravates Ca<sup>2+</sup>-dependent cardiomyopathy by exacerbating diastolic Ca<sup>2+</sup> release. *J Physiol.* 2014;592(9):1957-73.
- Lochner A**, Genade S, Moolman JA. Ischemic preconditioning: Infarct size is a more reliable endpoint than functional recovery. *Basic Res Cardiol* 2003;98(5): 337-46.
- Luo W**, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, et al. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 1994;75:401-9.
- Luo W.** et al. Transgenic approaches to define the functional role of dual site phospholamban phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1998;273,4734-9.

- MacDonnell SM**, Garcia-Rivas G, Scherman JA, Kubo H, Chen X, Valdivia H, et al. Adrenergic regulation of cardiac contractility does not involve phosphorylation of cardiac ryanodine receptor at serine 2808. *Circ Res.* 2008;102:e65–e72.
- MacLennan DH**, Rice WJ, Odermatt A, Green NM. Structure-function relationships in the Ca<sup>2+</sup>-binding and translocation domain of SERCA1: physiological correlates in Brody disease. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1998;643:55-67.
- MacLennan DH**, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(7):566-77.
- Maier LS** and Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(8):919-39.
- Mangoni ME**, Couette B, Marger L, Bourinet E, Striessnig J, Nargeot, J. Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes. *Prog.Biophys. Mol. Biol.* 2006;90:38–63.
- Manning G**, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002;298(5600):1912-34.
- Marshall KD**, Baines CP. Necroptosis: is there a role for mitochondria? *Frontiers in Physiology.* 2014;5:323.
- Martínez Demaría DR**, Cingolani HE, Mosca SM. Comparison of the effects of different magnesium administration times on infarct size. *Experimental & Clinical Cardiology.* 2003;8(1):17-20.
- Marx SO**, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* 2000;101:365–76.
- Mathers CD**, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3(11):e442.
- Matsui Y**, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, Levine B, Sadoshima J. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res.* 2007;100(6):914-22.
- Mattiazzi A**, Kranias EG. The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Front Pharmacol.* 2014;5:5.
- McCully JD**, Wakiyama H, Hsieh Y, Jones M, Levitsky S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286: H1923–H35.
- Meissner G**. Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium.* 2004;35(6):621-8.
- Mendis S**, Puska P, Norrving B. Global Atlas on Cardiovascular Disease and Prevention and Control. World Health Organisation, Geneva 2011.
- Mesirca P**, Torrente AG, Mangoni ME. Functional role of voltage gated Ca<sup>2+</sup> channels in heart automaticity. *Front. Physiol.* 2015;6:19.
- Meyer T**, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science.* 1992;256:1199–202.
- Minamino T**, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2010;107(9):1071-82.



- Minicucci MF**, Farah E, Fusco DR, et al. Infarct Size as Predictor of Systolic Functional Recovery after Myocardial Infarction. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2014;102(6):549-56.
- Mishra S**, Gray CB, Miyamoto S, Bers DM, Brown JH. Location matters: clarifying the concept of nuclear and cytosolic CaMKII subtypes. *Circ Res*. 2011;109(12):1354-62.
- Morgan MJ**, Kim YS, Liu ZG. TNF $\alpha$  and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res*. 2008;18:343-49.
- Moss RL, Fitzsimons DP. Myosin light chain 2 into the mainstream of cardiac development and contractility. *Circ Res*. 2006;99(3):225-7.
- Moss RL**, Razumova M, Fitzsimons DP. Myosin crossbridge activation of cardiac thin filaments: implications for myocardial function in health and disease. *Circ Res*. 2004;94(10):1290-300.
- Mozaffari MS**, Liu JY, Abebe W, Baban B. Mechanisms of load dependency of myocardial ischemia reperfusion injury. *Am J Cardiovasc Dis*. 2013;3(4):180-96.
- Mozaffarian D**, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):e38-e360.
- Nag AC**. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*. 1980; 28:41-61.
- Nakayama H**, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, Houser SR, Molkentin JD. Ca<sup>2+</sup>- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2431-44.
- Navedo MF**, Cheng EP, Yuan C, Votaw S, Molkentin JD, Scott JD, Santana LF. Increased coupled gating of L-type Ca<sup>2+</sup> channels during hypertension and Timothy syndrome. *Circ Res*. 2010;106:748-56.
- Nichols CG**, Lederer WJ. The role of ATP in energy-deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1990;68:183- 94.
- Nystrom G**. Ueber die Lymphbanen des Herzens. *Arch. Anat. Physiol. (Anat. Abt.)* 1897;21: 361-78.
- Olesen C**, Picard M, Winther AM, Gyruup C, Morth JP, Oxvig C, Møller JV, Nissen P. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature*. 2007;450(7172):1036-42.
- Olivetti G**, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, Gambert SR, Cigola E, Anversa P. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(9):2005-16.
- Oltvai ZN**, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74(4):609-19.
- Pacher P**, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev*. 2007;87:315-424.
- Palmaz JC**. New advances in endovascular technology. *Tex Heart Inst J*. 1997;24(3):156-9.
- Palojoki E**, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, Tikkanen I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(6):H2726-31.

**Pedrozo Z**, Sanchez G, Torrealba N, Valenzuela R, Fernandez C, Hidalgo C, et al. Calpains and proteasomes mediate degradation of ryanodine receptors in a model of cardiac ischemic reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 1802;2010:356–62.

**Periasamy M**, Reed TD, Liu LH, Ji Y, Loukianov E, Paul RJ, Nieman ML, Riddle T, Duffy JJ, Doetschman T, et al. Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *J Biol Chem*. 1999;274(4):2556-62.

**Periasamy M**, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve*. 2007;35(4):430-42.

**Periasamy M**, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res*. 2008;77(2):265-73.

**Picht E**, DeSantiago J, Huke S, Kaetzel MA, Dedman JR, Bers DM. CaMKII inhibition targeted to the sarcoplasmic reticulum inhibits. CaMKII inhibition targeted to the sarcoplasmic reticulum inhibits frequency-dependent acceleration of relaxation and Ca<sup>2+</sup> current facilitation. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(1):196-205.

**Piombo AC**, Rolandi F, Maurice MF, Salzberg S, Strumminger M, Zylberstejn H, Rubio E, Ulmete E, Di Pietro P, Mitelman J. Registro de calidad de atención del infarto agudo de miocardio en los hospitales públicos de la ciudad de Buenos Aires. *Rev. argent. cardiología*. 2011;79(2) Abril/Mayo 2011.

**Piper HM**, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1998;38(2):291-300

**Piper HM**, Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004;61: 365-71.

**Porzio MA**, Pearson AM. Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*. 1977;490(1):27-34.

**Qian J**, Ren X, Wang X, et al. Blockade of Hsp20 Phosphorylation Exacerbates Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Suppressed Autophagy and Increased Cell Death. *Circulation research*. 2009;105(12):1223-31.

**Rajtik T**, Carnicka S, Szobi A, Giricz Z, O-Uchi J, Hassova V, Svec P, Ferdinandy P, Ravingerova T, Adameova A. Oxidative activation of CaMKII $\delta$  in acute myocardial ischemia/reperfusion injury: A role of angiotensin AT1 receptor-NOX2 signaling axis. *Eur J Pharmacol*. 2016;771:114-22.

**Reichelt ME**, Willems L, Hack BA, Peart JN, Headrick JP. Cardiac and coronary function in the Langendorff-perfused mouse heart model. *Exp Physiol*. 2009;94(1):54-70.

**Rellos P**, Pike ACW, Niesen FH, et al. Structure of the CaMKII $\delta$ /Calmodulin Complex Reveals the Molecular Mechanism of CaMKII Kinase Activation. Taylor SS, ed. *PLoS Biology*. 2010;8(7):e1000426.

**Respress JL**, van Oort RJ, Li N, et al. Role of RyR2 Phosphorylation at S2814 during Heart Failure Progression. *Circ Res*. 2012;110(11):1474-83.

**Ringer S**. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol*. 1883; 4(1): 29–42.

**Rueda A**, de Alba-Aguayo DR, Valdivia HH. Receptor de rianodina, fuga de calcio y arritmias. *Archivos de cardiología de México*, 2014;84(3):191-201.

**Ruiz-Meana M**, García-Dorado D. Pathophysiology of Ischemia-Reperfusion Injury: New Therapeutic Options for Acute Myocardial Infarction. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:199-209.

**Said M**, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A. The relative relevance of phosphorylation of the Thr17 residue of phospholamban is different at different levels of  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Pflügers Arch*. 2002;444:801-9.

**Said M**, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C, Ferrero P, Kranias EG, Mattiazzi A. Role of dual-site phospholamban phosphorylation in the stunned heart: insights from phospholamban site-specific mutants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(3):H1198-205.

**Said M**, Becerra R, Palomeque J, Rinaldi G, Kaetzel MA, Diaz-Sylvester PL., Copello JA, Dedman JR, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, et al. Increased intracellular  $Ca^{2+}$  and SR  $Ca^{2+}$  load contribute to arrhythmias after acidosis in rat heart. Role of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2008;295:H1669-H83.

**Said M**, Becerra R, Valverde CA, et al. Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): A main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;51(6):936-44.

**Salas MA**, Valverde CA, Sanchez G, Said M, Rodriguez JS, Portiansky EL, et al. The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:1298-306.

**Sanchis D**, Llovera M, Ballester M, Comella JX. An alternative view of apoptosis in heart development and disease. *Cardiovasc Res*. 2008;77:448-51.

**Sanchis D**, Mayorga M, Ballester M, Comella JX. Lack of Apaf-1 expression confers resistance to cytochrome c-driven apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Death Differ*. 2003;10(9):977-86.

**Scholz D**, Diener W, Schaper J. Altered nucleus/cytoplasm relationship and degenerative structural changes in human cardiomyopathy. *Cardioscience*. 1994;5:127-38.

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

**Schultz J**, Glascock BJ, Witt SA, Nieman ML, Nattamai KJ, Liu LH, Lorenz JN, Shull GE, Kimball TR, Periasamy M. Accelerated onset of heart failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity. *Am.J.Physiol.HeartCirc.Physiol*. 2004;286:H1146-53.

**Shan J**, Kushnir A, Betzenhauser MJ, Reiken S, Li J, Lehnart SE, Lindegger N, Mongillo M, Mohler PJ, Marks AR. Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(12):4388-98.

**Shaw RM**, Colecraft HM. L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2013;98:177-86.

**Shintani-Ishida K**, Yoshida K. Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC- $\alpha$ , and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in reperfusion. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(7):743-51.

**Simmerman HK**, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR. Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem* 1986; 261:13333-41.

**Slater AF**, Stefan C, Nobel I, van den Dobbelssteen DJ, Orrenius S. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *ToxicolLett.* 1995;82-83:149-53.

**Slee EA**, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 1999;144(2):281-92.

**Smith CC**, Yellon DM. Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *J Cell Mol Med.* 2011;15(9):1797-806.

**Soeller C**, Cannell MB. Examination of the Transverse Tubular System in Living Cardiac Rat Myocytes by 2-Photon Microscopy and Digital Image-Processing Techniques. *Circ Res.* 1999;84: 266-75.

**Sossalla S**, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittköpper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, El-Armouche A, Hasenfuss G, Maier LS. Inhibition of elevated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res.* 2010;107(9):1150-61.

**Stern MD**, Cheng H. Putting out the fire: what terminates calcium-induced calcium release in cardiac muscle?. *Cell Calcium.* 2004;35(6):591-601.

**Stewart JM**, Page E. Improved stereological techniques for studying myocardial cell growth: application to external sarcolemma, T system, and intercalated disks of rabbit and rat hearts. *J Ultrastruct Res* 1978;65: 119-134.

**Stotz SC**, Jarvis SE, Zamponi GW. Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *J Physiol.* 2004; 554:263-273.

**Sun X**, Lee J, Navas T, Baldwin DT, Stewart TA, Dixit VM. RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *J Biol Chem.* 1999;274(24):16871-5.

**Suzuki M**, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell.* 2000;103(4):645-54

**Suzuki M**, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marbán E, Nakaya H. Role of sarcolemmal K<sub>ATP</sub> channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest.* 2002;109(4):509-516.

**Sweadner KJ**, Donnet C. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca(2+)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J.* 2001;356(3):685-704.

**Takasago T**, Imagawa T, Shigekawa M. Phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biochem. (Tokyo)* 1989;106:872-7.

**Takeda S**, Yamashita A, Maeda K, Maéda Y. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form. *Nature.* 2003;424(6944):35-41.

**Takeshima H**, Komazaki S, Hirose K, Nishi M, Noda T, Iino M. Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J.* 1998;17: 3309-16.

**Terentyev D**, Viatchenko-Karpinski S, Gyorke I, Terentyeva R, Gyorke S. Protein phosphatases decrease sarcoplasmic reticulum calcium content by stimulating calcium release in cardiac myocytes. *J Physiol.* 2003;552(1):109-18.

- Tinker A**, Williams AJ. Measuring the length of the pore of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel using trimethylammonium ions as molecular calipers. *Biophys. J.* 1995;68:111-20.
- Tobimatsu T**, Fujisawa H. J Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *Biol Chem.* 1989;264(30):17907-12.
- Tokumitsu H**, Takahashi N, Eto K, Yano S, Soderling TR and Muramatsu M. Substrate Recognition by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase. *J. Biol. Chem.* 1999;274(22):15803-10.
- Trahair T**, Yeoh T, Cartmill T, Keogh A, Spratt P, Chang V, dos Remedios CG, Gunning P. Myosin light chain gene expression associated with disease states of the human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1993;25(5):577-85.
- Treinys R**, Jurevičius J. L-type Ca<sup>2+</sup> channels in the heart: structure and regulation. *Medicina (Kaunas)*2008; 44(7):491-9.
- Uemura A**, Naito Y, Matsubara T, Hotta N, Hidaka H. Demonstration of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase cascade in the hog heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:355- 60.
- Valverde C.A.**, Mundiña-Weilenmann C., Reyes M., Kranias E.G., Escobar A.L., Mattiazzi A. Phospholamban phosphorylation sites are necessary for the recovery of intracellular Ca<sup>2+</sup> in the stunned heart of rodents. *Cardiovasc Res.* 2006;70:335-45.
- van Oort RJ**, McCauley MD, Dixit SS, Pereira L, Yang Y, Respress JL, et al. Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *Circulation* 2010;122:2669-79.
- Vandenabeele P**, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci. Signal.* 2010; 3:re4.
- Vangheluwe P**, Tjwa M, Van Den Bergh A, Louch WE, Beullens M, Dode L, Carmeliet P, Kranias E, Herijgers P, Sipido KR, et al. A SERCA2 pump with an increased Ca<sup>2+</sup> affinity can lead to severe cardiac hypertrophy, stress intolerance and reduced life span. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41(2):308-17.
- Vega AL**, Yuan C, Votaw VS, Santana LF. Dynamic changes in sarcoplasmic reticulum structure in ventricular myocytes. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:382586.
- Vetter SW** and Leclerc E. Novel Aspects of calmodulin target recognition and activation. *Eur. J. Biochem* 2003;270: 404-414.
- Vila-Petroff M**, Salas MA, SaidM, Valverde CA, Sapia L, Portiansky E, et al. CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2007;73:689-98.
- Vittone L**, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Mattiazzi A. Mechanisms involved in the acidosis enhancement of the isoproterenol-induced phosphorylation of phospholamban in the intact heart. *J Biol Chem.* 1998;273(16):9804-11.
- Vittone L**, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Mattiazzi A. Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(1):39-50.
- Voeltz GK**, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 2002;3(10):944-50.

**Walters AM**, Porter Jr. GA, Brookes PS. Mitochondria as a Drug Target in Ischemic Heart Disease and Cardiomyopathy. *Circ Res.* 2012;111:1222-36.

**Weaver WD**. Factors influencing the time to hospital administration of thrombolytic therapy: results from a large national registry. *Circulation* 1992;86(1):16.

**Weber KT**, Sun Y, Guntaka RV. Rebuilding and remodeling following myocardial infarction: the good, the bad, and the ugly of tissue repair. *Dialogues in Cardiovascular Medicine.*1999; 4: 3-19.

**Wehrens XHT**, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song LS, Roseblit N, et al. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell.* 2003 Jun 27;113(7):829-40.

**WehrensXH**, Lehnart SE, Reiken SR, MarksAR. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res.* 2004;94(6):e61-70.

**Wehrens XH**, Lehnart SE, Reiken S, van der Nagel R, Morales R, Sun J, Cheng Z, Deng SX, de Windt LJ, Landry DW, Marks AR. Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(27):9607-12.

**Wei MC**, Zong W-X, Cheng EH-Y, et al. Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science (New York, NY).* 2001;292(5517):727-30.

**Weinreuter M**, Kreusser MM, Beckendorf J, Schreiter FC, Leuschner F, Lehmann LH, Hofmann KP, Rostovsky JS, Diemert N, Xu C, et. al. CaM Kinase II mediates maladaptive post-infarct remodeling and pro-inflammatory chemoattractant signaling but not acute myocardial ischemia/reperfusion injury. *EMBO Mol Med.* 2014;6(10): 1231–45.

**Whelan RS**, Kaplinskiy V, KitsisRN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:19-44.

**Williamson BD**, Lim MJ, Buda AJ. Transient left ventricular filling abnormalities (diastolic stunning) after acute myocardial infarction. 1990;66(12):897–903.

**Witcher DR**, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J. Biol. Chem.* 1991;266:11144–52.

**Xiao B**, Jiang MT, Zhao M, Yang D, Sutherland C, Lai FA, Walsh MP, Warltier DC, Cheng H, Chen SR. Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ Res.* 2005;96(8):847-55.

**Xiao B**, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, ter Keurs H, Chen SRW. Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptor responding to protein kinase A activation upon  $\beta$ -adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem. J.* 2006;396:7–16.

**Yamniuk AP**, Vogel HJ Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides. *Mol Biotechnol* 2004;27:33–57.

**Yang J**, Ellinor PT, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW. Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup> selectivity and ion permeation in L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature.* 1993; 366(6451):158–161.

**Yang Y**, Zhu WZ, Joiner ML, Zhang R, Oddis CV, Hou Y, Yang J, Price EE, Gleaves L, Eren M, et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(6):H3065-75.

- Yaoita H**, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation*. 1998;97(3):276-81.
- Yetgin T**, Manintveld OC, Duncker DJ, van der Giessen WJ. Postconditioning against ischaemia-reperfusion injury: ready for wide application in patients?. *Netherlands Heart Journal*. 2010;18(7-8):389-92.
- Zalk R**, Lehnart SE, Marks AR. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:367-85.
- Zhang H**, Makarewich CA, Kubo H, Wang W, Duran JM, Li Y, Berretta RM, Koch WJ, Chen X, Gao E, et al. Hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine 2808 is not involved in cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res*. 2012;110(6):831-40.
- Zhang R**, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE Jr, Thiel W, Guatimosim S, Song LS, et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med*. 2005;11(4):409-17.
- Zhang T**, Zhang Y, Cui M, Jin L, Wang Y, Lv F, Liu Y, Zheng W, Shang H, Zhang J, et al. CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nat Med*. 2016;22(2):175-82.
- Ziegler U**, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*. 2004;19:124-8.
- Zoratti M**, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995;1241:139-76.