



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Rol de la CaMKII en las arritmias por
isquemia/reperfusión y estrés: Estudio del papel de la
recaptura del Ca²⁺ intracelular***

Tesista: Gabriela Mazzocchi

Director/a: Dra. Alicia R. Mattiazzi

Codirector/a: Dr. Carlos Valverde

Año:2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios, sin Él esta aventura hubiera sido imposible de vivir. Gracias Señor por ser mi refugio y acá abajo los brazos eternos (Deuteronomio 33:27, La Biblia).

Me siento profundamente agradecida con Alicia, al punto que no sé qué característica enumerar primero...su pasión, entrega, conocimiento, generosidad, paciencia e inteligencia han marcado mi vida. Gracias por permitirme ser parte de este proyecto, gracias por confiar en mí. Gracias.

¡‘Carlos’! ni bien empecé a desarrollar este trabajo supe que había sido bendecida por tenerte como instructor y después con el tiempo compañero. ¡Que paciencia y generosidad me demostraste desde el día cero! ¡Gracias y mil gracias!

Ariel Escobar: hay cuatro cosas que nunca voy a olvidar de vos: tu inteligencia, tu pasión, tu generosidad y por su puesto tu mano para la cocina. Gracias por compartir conmigo todo eso.

Hay tantas personas del Centro de Investigaciones Cardiovasculares que han sido tan buenos y generosos conmigo. Tantos que se han tomado el tiempo para responder preguntas, enseñarme cosas, discutir temas. Han compartido conmigo sus conocimientos y tiempo de una manera tan desinteresada que no sé cómo decirles gracias. De verdad, sería bueno que haya más gente como Uds. en todos los lugares de trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, los co autores del este trabajo. Realmente es así. Uds. levantaron mis brazos cuando yo no podía sostenerlos. Uds. iban a buscar la toalla, cada vez que yo quería tirarla. De Uds. aprendí tantas cosas, no solamente conocimiento técnico... que quizás en algún momento de mi vida pueda olvidarlo, de Uds. aprendí la generosidad, el compañerismo, aprendí a reírme de los errores, aprendí que la vida es mucho mejor compartida...gracias por compartir conmigo todo esto.

Marce y Yuriana. Muchas gracias. Hicieron que mis días en Estados Unidos fueran agradables. Era lindo saber que llegaba al Labo y Uds. estaban ahí. Gracias por ser tan amables conmigo.

He sido tan dichosa que además de este viaje he cosechado amigos. Lu, mi querida, no sabes lo valioso para mí que fue tu amistad todo este tiempo...Gracias. Mi querido Nehuén...que decirte... ¡que divertido era trabajar con vos cerca! y que buen viaje que fue Río 2016, ¡gracias por convencerme de hacerlo! .Sole, Barbi y Sofi...tres locas lindas lindas que llenaron mis días de risas y también de pensamientos serios sobre toda esta locura que es la vida.

A mis amigos de toda la vida y también a los amigos que me regaló La Plata. Uds. saben quiénes son.
Soy afortunada por haberme cruzado con Uds.

A mi familia...mi apoyo incondicional....Dios ha sido tan bueno por regalármelos a Uds.

Mami...

Tu fe inquebrantable en Dios, tu voluntad de hierro, tu amor y confianza ciega en mí me sostienen y me inspiran.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS	14
NOMENCLATURA	15
INTRODUCCIÓN	17
I. ACOPLAMIENTO ÉXCITO-CONTRÁCTIL.....	19
1. EVENTOS A NIVEL DE LA MEMBRANA CELULAR: EL POTENCIAL DE ACCIÓN.....	19
1.1. POTENCIAL DE ACCIÓN DE LAS CÉLULAS VENTRICULARES	20
1.2. ESTRUCTURAS Y PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL AEC.....	22
1.2.1. Sarcolema.....	22
1.2.2. Túbulos Transversales.....	23
1.2.3. Retículo Sarcoplasmático.....	23
1.2.4. Mitocondrias	24
1.2.5. Canales de Ca^{2+}	24
1.2.6. Receptores de Rianodina.....	25
1.2.7. Calsequestrina (CSQ).....	26
1.2.8. Bomba de Ca^{2+} del RS o SR- Ca^{2+} -ATPasa (SERCA).	26
1.2.9. Fosfolamban (PLN)	27
1.2.10. ATPasa del sarcolema (PMCA).....	28
1.2.11. Bomba Na^+/K^+	28
1.2.12. Intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX).....	29
2. EL APARATO CONTRÁCTIL.....	30
2.1. EL SARCÓMERO Y LAS PROTEÍNAS CONTRÁCTILES.....	30

3.	CICLO AEC	33
II.	REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE INTERVIENEN EN EL AEC	35
1.	CaMKII Y PKA.....	35
1.1.	CaMKII.....	35
1.2.	PKA.....	36
2.	REGULACIÓN DE LOS CANALES DE Ca ²⁺ TIPO L.....	37
2.1.	REGULACIÓN DE LOS CANALES DE Ca ²⁺ TIPO L POR CaMKII.....	37
2.2.	REGULACIÓN DE LOS CANALES DE Ca ²⁺ TIPO L POR PKA.....	37
3.	REGULACIÓN DE PLN	38
3.1.	REGULACIÓN POR CaMKII Y PKA.....	38
3.2.	DESFOSFORILACIÓN DE LA PLN.....	39
4.	REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE RIANODINA TIPO 2.....	40
4.1.	REGULACIÓN DEL RyR2 POR FOSFORILACIÓN.....	40
4.1.1.	Dependientes de CaMKII.....	40
4.1.2.	Dependientes de PKA	41
4.2.	REGULACIÓN DEL RyR2 POR OXIDOREDUCCIÓN Y NITROSILACIÓN	42
4.3.	REGULACIÓN DEL RyR2 POR EL Ca ²⁺ INTRARRETICULAR: ROL DE LA CALSECUESTRINA, JUNTINA, TRIADINA Y LA PROTEÍNA DE UNIÓN DE Ca ²⁺ RICA EN HISTIDINA.....	43
4.3.1.	Regulación por CSQ.....	43
4.3.2.	Regulación del RyR2 por el Ca ²⁺ intraluminal.....	45
4.3.3.	Regulación del RyR2 por Ca ²⁺ extracelular.....	45
III.	ARRITMIAS	48
1.	MECANISMO DE GENERACIÓN DE ARRITMIAS POR Ca ²⁺	48

1.1.	ARRITMIAS GENERADAS A NIVEL CELULAR. ROL DEL RyR2 Y DE LA CaMKII. . .	50
1.2.	ARRITMIAS GENERADAS A NIVEL CELULAR. ROL DEL LA RECAPTURA DE Ca ²⁺ DEL RS.....	51
	HIPÓTESIS.....	55
	OBJETIVOS	55
	MATERIALES YMÉTODOS	56
1.	ANIMALES	56
2.	HISTOLOGÍA.....	57
3.	EXAMEN ECOCARDIOGRÁFICO.....	57
4.	ELECTROCARDIOGRAMA.....	57
5.	PERFUSIÓN DE CORAZONES AISLADOS DE RATÓN.....	58
6.	TÉCNICA DE MICROELECTRODOS INTRACELULARES PARA MEDICIÓN DE POTENCIALES DE ACCIÓN.....	59
7.	TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA MEDICIÓN DE PA y Ca ²⁺ INTRACELULAR.....	60
7.1.	INDICADORES FLUORESCENTES.....	60
7.1.1.	Di-8-ANEPPS	60
7.1.2.	Rhod-2 AM.....	61
7.1.3.	Mag-Fluo-4 AM.....	63
7.1.4.	Fluo-4 AM	64
7.2.	CARGA DE LOS CORAZONES CON LOS INDICADORES FLUORESCENTES.....	65
7.2.1.	Rhod-2 AM, Mag-Fluo-4 AM y Fluo-4 AM.	65
7.2.2.	Di-8-ANEPPS	66
7.3.	MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE CAMPO LOCAL PULSADO (PLFFM)	66

7.4.	PROTOCOLO DE RESTITUCIÓN DE LA LIBERACIÓN DE Ca ²⁺ (RLC):	67
7.5.	PROTOCOLO DE INDUCCIÓN DE ARRITMIAS POR ESTRÉS (ALTA FRECUENCIA Y ALTO Ca ²⁺ EXTRACELULAR).	68
8.	ONDAS DE Ca ²⁺ EN EL CORAZÓN INTACTO.....	69
9.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	69
9.1.	PARÁMETROS DE Ca ²⁺ INTRACELULAR.....	69
9.2.	POTENCIALES DE ACCIÓN.....	71
9.3.	MICROSOCOPÍA CONFOCAL	72
10.	ESTADÍSTICA	72
	RESULTADOS.....	73
1.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES SDKO	73
1.1.	CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS RATONES SDKO.....	73
1.2.	CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LOS RATONES SDKO.....	75
2.	CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA DE Ca ²⁺ DE LOS RATONES SDKO	76
3.	CARACTERIZACIÓN DE LOS PA DE LOS RATONES SDKO.....	79
4.	LA ABLACIÓN DE LA FOSFOLAMBAN REDUJO LAS ARRITMIAS VENTRICULARES PROMOVIDAS POR LA FOSFORILACIÓN POR CaMKII DEL SITIO Ser ²⁸¹⁴ DE LOS RyR2 BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS	81
5.	LA ABLACIÓN DE LA FOSFOLAMBAN REDUJO LAS ARRITMIAS VENTRICULARES PROMOVIDAS POR LA FOSFORILACIÓN DE LA CaMKII DEL SITIO Ser ²⁸¹⁴ DE LOS RyR2 EN LA I/R.	83
6.	LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA SERCA2a REVIRTIÓ EL EFECTO PROTECTOR DE LA ABLACIÓN DE LA PLN EN LOS RATONES SDKO.	86
7.	LA ABLACIÓN DE PLN AUMENTÓ LA PÉRDIDA DE Ca ²⁺ MEDIADA POR CHISPAS DE Ca ²⁺ DEL RS PERO DISMINUYÓ LA OCURRENCIA DE ONDAS DE Ca ²⁺ INDUCIDAS POR I/R EN CORAZONES INTACTOS.....	87
	DISCUSIÓN.....	90

1. CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LOS RATONES SDKO.	90
2. LA ABLACIÓN DE LA PLN REDUJO LAS ARRITMIAS VENTRICULARES PROMOVIDAS POR LA FOSFORILACIÓN DE LA CaMKII DEL SITIO Ser ²⁸¹⁴ DE LOS RyR2 BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS Y EN I/R.	91
2.1. ROL DEL INCREMENTO DE LA PÉRDIDA DE Ca ²⁺ DEL RS POR FOSFORILACIÓN DEPENDIENTE DE CaMKII EN LAS ARRITMIAS DISPARADAS POR Ca ²⁺	91
2.2. ROL DE LA AUMENTO EN LA RECAPTURA DE Ca ²⁺ DEL RS POR ABLACIÓN DE LA PLN EN LAS ARRITMIAS DISPARADAS POR Ca ²⁺	92
3. LA INHIBICIÓN DE LA SERCA2a REVIRTIÓ EL EFECTO PROTECTOR DE LA ABLACIÓN DE LA PLN EN LOS RATONES SDKO.....	89
CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del sistema de conducción del corazón.....	20
Figura 2. Potencial de acción ventricular	20
Figura 3. Principales flujos iónicos que determinan las fases del PA	21
Figura 4. Correspondencia temporal entre el PA ventricular y el ECG	22
Figura 5. Diagrama de la disposición de los túbulos T, RS, mitocondrias y miofibrillas en la célula cardíaca.....	23
Figura 6. Estructura lineal del Canal de Ca ²⁺ tipo L.....	25
Figura 7. Estructura tridimensional del RyR2.....	26
Figura 8. Modelo estructural de la proteína fosfolamban.....	27
Figura 9. Diagrama del intercambiador NCX.	29
Figura 10. Intercambiador NCX. Modo directo e inverso	30
Figura 11. Esquema del sarcómero y disposición espacial de los filamentos gruesos y finos	30
Figura 12. Esquema de la estructura de la miosina	31
Figura 13. Esquema del filamento fino de actina y proteínas asociadas.	32
Figura 14. Principales proteínas que componen el sarcómero.	32
Figura 15. AEC	33
Figura 16. Rol del Ca ²⁺ en el AEC.....	34
Figura 17. Diagrama lineal de una subunidad de CaMKII.....	35
Figura 18. Fosforilación de las proteínas del AEC por CaMKII.....	36
Figura 19. Fosforilación de las proteínas del AEC por estimulación β_1 adrenérgica.....	37
Figura 20. Modelo de regulación alostérica de la SERCA2a por la PLN.	39
Figura 21. Modelo de RyR2 que muestra el concepto de “zona caliente” de fosforilación.....	42

Figura 22. Receptor de rianodina tipo 2.....	44
Figura 23. Principales mecanismos candidatos para la liberación de Ca^{2+} por RS.....	47
Figura 24. Factores determinantes de la pérdida de Ca^{2+} del RS.....	49
Figura 25. Mecanismos de generación de potenciales de acción espontáneos disparados por Ca^{2+}	50
Figura 26. El incremento en la recaptura de Ca^{2+} del RS disminuye el Ca^{2+} citosólico e incrementa la pérdida de Ca^{2+} del RS.....	54
Figura 27. Sistema utilizado para el registro de ECG superficial.....	58
Figura 28. Montaje para la técnica de microelectrodos intracelulares.....	59
Figura 29. Protocolo de I/R.....	60
Figura 30. Fórmula del Di-8-ANEPPS.....	61
Figura 31. Espectro de excitación y emisión del Di-8-ANNEPS.....	61
Figura 32. Fórmula del Rhod-2 AM.....	62
Figura 33. Espectro de excitación y emisión del Rhod-2 AM.....	63
Figura 34. Fórmula del Mag-Fluo-4 AM.....	63
Figura 35. Espectro de excitación y emisión del Mag-Fluo-4AM.....	64
Figura 36. Fórmula del Fluo-4 AM.....	64
Figura 37. Espectro de excitación y emisión del Fluo-4 AM.....	65
Figura 38. Sistema PLFFM.....	67
Figura 39. Protocolo para obtención curvas RLC.....	68
Figura 40. Protocolo de arritmias bajo estrés.....	68
Figura 41. Parámetros estudiados en los transitorios de Ca^{2+}	70
Figura 42. Cálculo de constante de RLC.....	70
Figura 43. Cálculo de parámetros en PAS.....	71

Figura 44. Características estructurales de los ratones SDKO.....	74
Figura 45. Características mecánicas de los corazones de ratones SDKO.....	76
Figura 46. Tiempo medio de relajación de transitorio de Ca^{2+} citosólico e intra RS.....	77
Figura 47. Constante de relajación tau y velocidad de relajación tau^{-1}	78
Figura 48. Restitución de la liberación de Ca^{2+} (RLC) citosólica.....	79
Figura 49. La ablación de PLN no genera cambios en la configuración del PA pero sí una tendencia a un incremento de la duración del mismo.....	80
Figura 50. Restitución eléctrica.....	81
Figura 51. La ablación de PLN rescata de la propensión a arritmias ventriculares promovida por la fosforilación constitutiva del RyR2 en el sitio Ser^{2814} dependiente de CaMKII <i>in vivo</i>	82
Figura 52. La ablación de la PLN rescata la propensión a arritmias ventriculares promovidas por la fosforilación constitutiva del sitio Ser^{2814} del RyR2 en corazones <i>ex vivo</i>	83
Figura 53. La ablación de la PLN rescata las arritmias de reperfusión en corazones perfundidos.....	84
Figura 54. La ablación de la PLN rescata las arritmias de reperfusión en corazones perfundidos.....	85
Figura 55. Resultados de los efectos de la inhibición farmacológica de la SERCA2a en los latidos ventriculares prematuros en los ratones SDKO <i>ex vivo</i>	86
Figura 56. Registro confocal típico obtenido durante la reperfusión de corazones SDKO.....	88
Figura 57. Resultados del estudio de ondas de Ca^{2+} con microscopía confocal.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Autores que estudiaron el aumento de recaptura de Ca^{2+} del RS y su consecuencia sobre las arritmias disparadas por Ca^{2+}	53
Tabla 2. Datos estructurales de ratones SDKO.....	75

NOMENCLATURA

[Ca ²⁺]	Concentración de Ca ²⁺
+dP/dtmáx	Máxima velocidad de desarrollo de presión ventricular izquierda
°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosindifosfato
AEC	Acoplamiento éxcito-contráctil
Ala	Aminoácido alanina
AMPc	Adenosin 3',5'-monofosfato cíclico
ARR	Arritmias
ATP	Adenosintrifosfato
ATPasa	Actividad enzimática con capacidad de hidrolizar ATP
Ca ²⁺	Ion calcio
CaM	Calmodulina
CaMK	Proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺ y CaM
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺
CPA	Ácido ciclopiazónico
CPVT	Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica
CSQ	Calsecuestrina
DAD	Post-despolarización tardía de la membrana plasmática
DHPR	Receptor de dihidropiridinas – canales de Ca ²⁺ tipo L
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAD	Post-despolarización temprana de la membrana plasmática
FKBP	Proteína de unión de FK506
GMPc	Guanidil 3',5'-monofosfato cíclico
HRC	Proteína unidora de Ca ²⁺ rica en histidina (<i>Histidine Rich Calcium binding protein</i>).
I/R	Isquemia y reperfusión
jRS	Retículo sarcoplasmático de unión (en inglés, Junctional RS)
KCl	Cloruro de potasio
Kd	Constante de disociación
kDa	Kilodaltons
kHz	Kilo Hertz
LVP	Latido ventricular prematuro
MF	Miofilamento
min	Minutos
MLCK	Proteína quinasa de la cadena liviana de la miosina
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercurio
mV	Milivoltios
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	Bomba de sodio y potasio ATPasa
NaCl	Cloruro de sodio
NCX	Intercambiador sodio-calcio
nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxígeno
PA	Potencial de acción
PDVI	Presión desarrollada del ventrículo izquierdo
PDFVI	Presión diastólica final del ventrículo izquierdo
PFD	Presión de fin de diástole
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína quinasa C
PKG	Proteína quinasa dependiente de GMPc

PLN	Fosfolamban
PLNKO	Cepa mutante con ablación de la PLN
PMCA	Bomba de Ca^{2+} ATPasa del sarcolema dependiente de CaM
Po	Probabilidad de apertura
PP	Fosfatasa
Preisq	Período preisquémico
PVI	Presión de ventrículo izquierdo
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor de rianodina
RyR2	Receptor de rianodina tipo 2
seg	Segundos
Ser	Aminoácido serina
S2814A	Cepa mutante del RyR2 (el sitio Ser ²⁸¹⁴ fue reemplazado por alanina)
S2814D	Cepa mutante del RyR2 (el sitio Ser ²⁸¹⁴ fue reemplazado por un residuo aspartato)
SDKO	Cepa doble mutante producto de la cruce de las cepas PLNKO y S2814D.
SERCA2a	Bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículosarco (endo) plasmático tipo 2
t50 o t1/2	Tiempo hasta la mitad de la relajación
Thr	Aminoácido treonina
Tm	Tropomiosina
Tn	Troponina
UA	Unidades arbitrarias
VI	Ventrículo izquierdo
W	Vatio, unidad de potencia
WT	Cepa silvestre o control de ratón.
nM, μM , mM, M	Concentración nanomolar, micromolar, milimolar, molar

INTRODUCCIÓN

La disfunción mecánica y las arritmias son dos hechos característicos de la insuficiencia cardíaca (IC), una causa principal de morbimortalidad a nivel mundial (Cleland y col., 2002; Mozaffarian y col., 2007; Benjamin y col., 2017). Actualmente se conoce que el mal manejo del calcio (Ca^{2+}) es una causa principal de esas dos alteraciones típicas de la IC (Hasenfuss y col., 2002; Pogwizd y col., 2004; Luo y col., 2013). Es sabido además que una fracción importante de las arritmias ventriculares de la IC se inician a nivel celular por mecanismos disparados focalmente, tales como las descargas espontáneas y anormales de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático (RS), que se propagan como ondas de Ca^{2+} regenerativas a través de las células cardíacas (Cowling y col., 2013). Las ondas espontáneas de Ca^{2+} son arritmogénicas debido a que activan corrientes de membrana despolarizantes, fundamentalmente a través del intercambiador electrogénico $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) trabajando en su modo directo (Pogwizd y col., 2004; Laurita y col., 2008; Luo y col., 2013).

Un aumento de la pérdida de Ca^{2+} por el RS (Ca^{2+} leak) se produce en condiciones en las que la carga del RS excede un umbral que está principalmente determinado por el estado particular de los receptores de rianodina o canales liberadores de Ca^{2+} del RS (RyR2). Por ejemplo, mutaciones puntuales de los RyR2 hacen que estos canales se vuelvan más proclives a la pérdida espontánea de Ca^{2+} por el RS, frente a un estímulo adrenérgico. Los pacientes que padecen esta anomalía hereditaria exhiben taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT), una causa conocida de muerte súbita (Liu y col., 2008). La fosforilación del RyR2 mediada por la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina II (CaMKII) en el residuo Ser²⁸¹⁴ del RyR2, se ha asociado con un aumento de la pérdida de Ca^{2+} por el RS y con arritmogénesis en patologías cardíacas de diferente etiología (Ai y col., 2005; Chelu y col., 2009; Gonano y col., 2011; Said y col., 2008, 2011). La CaMKII está sobreexpresada y más activa en la IC y diversas evidencias experimentales indican que la fosforilación del RyR2 en el sitio Ser²⁸¹⁴ constituye el principal mecanismo de arritmias en esta enfermedad (Ai y col., 2005). Estos resultados sugieren un rol crucial de la alteración de la actividad de los RyR2 en las arritmias disparadas por Ca^{2+} .

En contraste, el efecto de aumentar la recaptura de Ca^{2+} por el RS sobre este tipo de eventos es poco claro y hay preocupación acerca de si el aumento del mismo, que se conoce como una terapéutica útil para revertir la disminución de la contractilidad de la IC al menos en animales (Hajjar y col., 2008), es protector respecto a las arritmias disparadas por Ca^{2+} o si por el contrario, las exacerba. Esta preocupación tiene soporte experimental debido a que se han obtenido resultados contradictorios de los efectos del aumento de la recaptura de Ca^{2+} en distintos tipos de arritmias, en algunos casos beneficiosos (Davia y col., 2001; del Monte y col., 2004; Prunier y col., 2008; Bai y col., 2013) y en otros perjudiciales (Lukyanenko y col., 1999; Landgraf y col., 2004; Stokke y col., 2010; Liu y col.,

2015). Estos datos indican que el efecto del aumento de la recaptura de Ca^{2+} por el RS sobre las arritmias disparadas por Ca^{2+} no es claro y que se necesitan estudios orientados a esclarecer este efecto y la causa de las discordancias previas.

El presente Trabajo de Tesis se propone estudiar el efecto del aumento de la recaptura de Ca^{2+} por el RS cardíaco sobre la propensión a arritmias por estrés y por reperfusión que produce la fosforilación mediada por CaMKII del sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2.

A manera de introducción y para una mejor comprensión del tema y de los conceptos vertidos precedentemente, explicaremos en primer lugar, los diferentes pasos y procesos que forman parte del acoplamiento excito-contráctil (AEC) en el músculo cardíaco. Luego se detallará la función de las proteínas que intervienen en el AEC y su regulación. Por último se describirá la generación de arritmias en el corazón, específicamente las que ocurren por estrés y durante la reperfusión luego de un período de isquemia.

I. ACOPLAMIENTO EXCITO-CONTRACTIL

Se denomina “acoplamiento éxcito-contráctil” (AEC) al conjunto de eventos que comienzan con la despolarización de la membrana plasmática luego del estímulo y que dan por resultado el aumento de Ca^{2+} citoplasmático y consecuentemente la contracción muscular. El Ca^{2+} cumple un papel de conexión o acoplamiento entre los eventos a nivel de la membrana plasmática y la contracción muscular, que ocurre a nivel de los miofilamentos, en el interior de la célula.

1. EVENTOS A NIVEL DE LA MEMBRANA CELULAR: EL POTENCIAL DE ACCIÓN

El evento que inicia el AEC es el potencial de acción (PA). El PA es una onda del potencial de membrana (E_m) determinada por una compleja interacción de diferentes canales iónicos y transportadores. El PA influye sobre la actividad de los canales iónicos y transportadores y determina la generación del transitorio de Ca^{2+} .

El latido cardíaco normal se inicia en el nódulo sinoauricular (SA), debido a que estas células poseen la propiedad de automatismo, es decir son capaces de autoestimularse porque su membrana plasmática se despolariza espontáneamente hasta llegar al umbral de excitabilidad. Las células del SA están más despolarizadas en reposo y tienen además una mayor velocidad de despolarización diastólica con respecto a otras células del sistema de conducción cardíaco, de ahí su función de marcapaso principal. El potencial de acción se propaga por las paredes auriculares a través de haces preferenciales al nódulo auriculoventricular y desde allí, luego de un retraso fisiológico, a la red de Purkinje ventricular a través del haz de His (Figura 1). Si bien el PA es heterogéneo, es decir varía en las diferentes regiones del corazón, e incluso a través de la pared del ventrículo (transmural), describiremos aquí sólo el PA de los miocitos ventriculares y las corrientes que lo determinan.

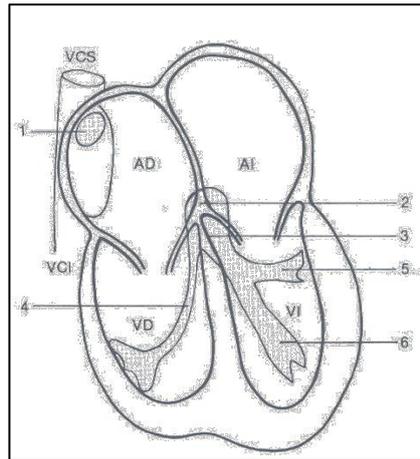


Figura 1. Esquema del sistema de conducción del corazón. 1, nódulo sinoauricular; 2, nódulo auriculoventricular, 3, Haz de His, 4, rama derecha del haz de His; 5, división posterior de la rama izquierda del haz de His; 6, división anterior de la rama izquierda del haz de His; VCS, vena cava superior, VCI, vena cava inferior, AD y AI: aurícula derecha y aurícula izquierda respectivamente, VD y VI: ventrículo derecho y ventrículo izquierdo respectivamente (Tomado de Cingolani y Houssay, Cap 21., 2002).

1.1. POTENCIAL DE ACCIÓN DE LAS CÉLULAS VENTRICULARES

En la Figura 2 se muestra un esquema de un PA ventricular, que puede dividirse en 5 fases. La fase 4 corresponde al potencial de membrana en ausencia de actividad eléctrica (PR, potencial de reposo). La fase 0, denominada despolarización rápida, desplaza el E_m a valores positivos entre +15-25 mV; ésta es seguida por una corta repolarización rápida temprana, la fase 1, que retorna el potencial de membrana a valores cercanos a 0. Luego tiene lugar la fase 2 o meseta que ocupa el 70% de la duración del PA y es característica del PA cardíaco ventricular. A continuación, la fase 3 es una repolarización rápida que retorna el potencial de membrana al valor del potencial de reposo.

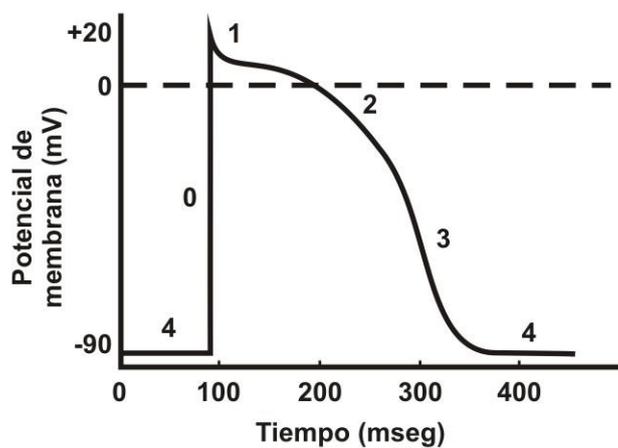


Figura 2. Potencial de acción ventricular (Tomado de Cingolani y Houssay, Cap 21., 2002).

Existen ciertos factores característicos en estas fases que son las que determinan las propiedades del miocardio. La velocidad de despolarización de la *fase 0* cumple un rol fundamental en la conducción. La duración de la *fase 2* regula la entrada de Ca^{2+} , factor clave en el AEC y es responsable de que durante este periodo el miocardio no pueda contraerse tetánicamente si recibe una frecuencia muy elevada de estímulos, porque durante este periodo la célula se encuentra en periodo refractario.

En la Figura 3 se muestran los movimientos iónicos responsables de las diferentes fases.

Fase 4 (PR): Corriente de potasio con rectificación hacia adentro (I_{K1}).

Fase 0: Corriente de sodio (I_{Na}).

Fase 1: Corriente transitoria hacia afuera (I_{to}). Se debe principalmente al egreso de K^+ . También a un ingreso de Cl^- .

Fase 2: Corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}).

Fase 3. Corriente tardía de potasio (I_K)

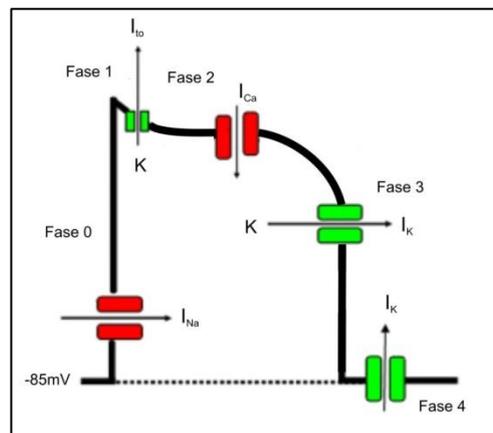


Figura 3. Principales flujos iónicos que determinan las fases del PA (Modificado de Cingolani y Houssay, Cap 21., 2002).

Existe una relación entre el electrocardiograma, ECG y el PA. En Figura 4 se muestra un esquema de ello.

La onda P del ECG se corresponde a la actividad auricular y el complejo QRS, el segmento ST y la onda T corresponden a la actividad ventricular. El complejo QRS se corresponde con la *fase 0* del PA, el segmento ST a la *fase 2*, y la onda T a la repolarización tardía, *fase 3*. Se debe tener en cuenta que la relación entre los eventos eléctricos en las células ventriculares y las diferencias de potencial registradas sobre la superficie corporal son más complejas que lo que se ha expuesto más arriba y esto es debido a que el complejo QRS y la onda T representan el promedio de todos los PA de los millones de células ventriculares que se despolarizan durante el periodo en el que el PA se propaga a través de

los ventrículos. A pesar de esto, el intervalo QT ofrece un índice aproximado de la duración del PA(Cingolani y Houssay, 2002).

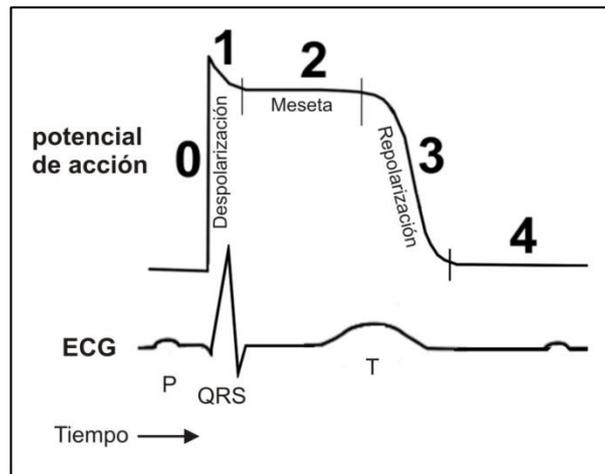


Figura 4. Correspondencia temporal entre el PA ventricular y el ECG (Modificado de Cingolani y Houssay, Cap 21., 2002).

1.2. ESTRUCTURAS Y PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL AEC

Debido al rol fundamental del Ca^{2+} en el AEC se enumerarán y detallarán sucintamente las principales estructuras relacionadas a los movimientos de Ca^{2+} .

1.2.1. Sarcolema

Se denomina sarcolema a la membrana externa que rodea las células musculares. Por fuera del sarcolema se encuentra la membrana basal o glicocáliz que es una cubierta formada por glicoproteínas y mucopolisacáridos. El sarcolema presenta invaginaciones que penetran en el interior de la célula: los túbulos transversales o túbulos T que se describirán más adelante.

El complejo sarcolema-glicocáliz tiene un gran número de sitios con carga negativa (debido a los mucopolisacáridos ácidos, aminoácidos ácidos y fosfolípidos que lo componen), que poseen una gran afinidad por el Ca^{2+} . Éste entra a la célula fundamentalmente por los canales de Ca^{2+} tipo L de la membrana plasmática (se describen más adelante). En determinadas circunstancias, el Ca^{2+} puede entrar además a la célula por el intercambiador NCX, aunque en condiciones fisiológicas éste trabaja principalmente sacando Ca^{2+} de la célula.

1.2.2. Túbulos Transversales

En el músculo cardíaco los túbulos transversales o túbulos T son invaginaciones de gran diámetro de la membrana plasmática hacia el interior de la célula. Estas invaginaciones están acompañadas por el glicocálix. Una de las funciones de este sistema es la de conducir hacia el interior de la célula cardíaca la onda de despolarización (PA) con la posterior entrada de Ca^{2+} y liberación del mismo desde los reservorios intracelulares (RS).

1.2.3. Retículo Sarcoplasmático

El retículo sarcoplasmático (RS) es el mayor depósito de Ca^{2+} del tejido muscular y tiene como rol clave la liberación y recaptura del Ca^{2+} hacia y desde el citosol, respectivamente. Por tal motivo participa en dos eventos fundamentales de la célula muscular: el AEC y la relajación.

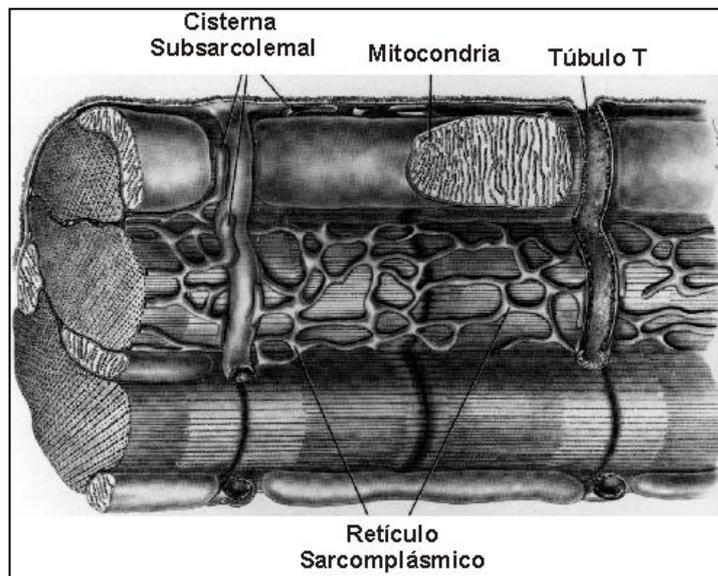


Figura 5. Diagrama de la disposición de los túbulos T, RS, mitocondrias y miofibrillas en la célula cardíaca (Fotografía modificada de Fawcett y col., 1969).

En el músculo estriado el RS toma la forma de un conjunto de túbulos anastomosados entre sí que rodean a las miofibrillas (Figura 5). Estos se disponen de manera longitudinal y se unen en su zona central y ensanchan en el extremo terminal dando lugar a las denominadas “cisternas terminales”, con orientación transversal. Cualquiera de las ramificaciones de los túbulos T se situará en medio del extremo terminal de dos sarcómeros consecutivos, inmediatamente por encima de la línea "Z". Esta alineación: cisterna del RS/túbulo T/cisterna del RS se conoce como *triada*, formación típica del músculo esquelético. En el músculo cardíaco lo que se encuentra más frecuentemente es la conjunción de dos elementos: una cisterna terminal y un túbulo T. Esta formación se denomina *díada*. También es común observar la unión entre una cisterna terminal y el sarcolema (cisterna subsarcolemal). Las

asociaciones descritas resultan útiles para el proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, sigla en inglés para este fenómeno que se describe con más detalle más adelante), y en último término para la producción de la contracción muscular. Efectivamente, en los túbulos T se encuentra una gran densidad de canales de Ca^{2+} , encargados de ingresar Ca^{2+} durante la despolarización de la membrana plasmática de la célula cardíaca. Dicho Ca^{2+} es el que se unirá a los RyR2 del RS para provocar la liberación de más Ca^{2+} del mismo.

En el lumen del RS se encuentran otras proteínas. Una de ellas, llamada calsequestrina, actúa como amortiguador del Ca^{2+} . Otras proteínas asociadas al RS son la juntina y triadina, que intervienen junto a la calsequestrina, en la regulación del RyR2. Todas estas proteínas se describirán con más detalle en un apartado posterior

1.2.4.Mitocondrias

Las mitocondrias son las organelas donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo que provee de energía a la célula. En el músculo cardíaco son muy numerosas y de mayor tamaño comparadas con las que se encuentran en otro tipo de tejido. Se hallan “empaquetadas” entre las filas de sarcómeros. Esta disposición hace menor la distancia para la difusión del ATP entre mitocondria y los miofilamentos (Figura 5). También están en estrecho contacto con el RS.

1.2.5.Canales de Ca^{2+}

Hay distintas clases de canales de Ca^{2+} : tipo T (transitorio), L (lento), N (por ser específicos del sistema nervioso) y P (por haber sido caracterizados por primera vez en células de Purkinje en cerebelo). El tejido cardíaco contiene canales tipo L y T.

Los canales del tipo T son activados a E_m más positivos que -60mV , se inactivan con rapidez y se pueden bloquear con níquel (Ni^{2+}). Los tipo L se activan a E_m más positivos que -40mV y entre las drogas que lo bloquean se puede mencionar a las dihidropiridinas, como la nifedipina o la nitrendipina. Los canales de Ca^{2+} del tipo L son los relevantes en el AEC. Y por último los de tipo N se activan a un voltaje intermedio entre los T y los L. Éstos cumplirían con el rol de permitir la entrada de Ca^{2+} en las terminaciones nerviosas en la transmisión sináptica neuromuscular. Este mismo rol en la unión neuromuscular en mamíferos y en diferentes neuronas del sistema nervioso central lo llevarían a cabo los canales tipo P (Bers, 2001).

Como se mencionó, los canales de tipo L, cumplen el rol de vía de entrada del Ca^{2+} hacia el interior de la célula. Se encuentran ubicados en la membrana celular y se abren durante el PA. También se los

denomina receptores de dihidropiridinas por su capacidad de fijar dichos compuestos. En el músculo cardíaco, una pequeña entrada de Ca^{2+} durante el PA a través de este canal promueve una liberación de Ca^{2+} del RS. Este mecanismo recibe el nombre de “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ” (CICR: Ca^{2+} -induced- Ca^{2+} -release) (Fabiato y col., 1975), fundamental para el AEC y que se describirá más adelante.

Estructuralmente los canales de Ca^{2+} tienen un peso molecular de 250 a 270 kDa. Están conformados por 5 subunidades: α_1 , α_2 , β , γ y δ . La subunidad α_1 es la que le otorgaría al canal las principales características del mismo. A su vez esta subunidad está formada por 4 dominios (I al IV) y cada uno de ellos posee 6 segmentos transmembrana hidrófobos (denominados S1-S6) con interconexiones intra y extracelulares. El segmento S4 sería el sensor de potencial ya que contiene residuos cargados positivamente: lisina y arginina. Los últimos 2 segmentos (S5 y S6) estarían unidos por un tramo más largo que los otros, en forma de horquilla, que se denomina H5 o P. La relevancia del tramo H5 se debe a que los aminoácidos que lo forman son, junto a los segmentos P de las otras 3 subunidades, los que tapizan el poro del canal alrededor del cual se juntan las 4 subunidades para generarlo (Figura 6) (Bers, 2001).

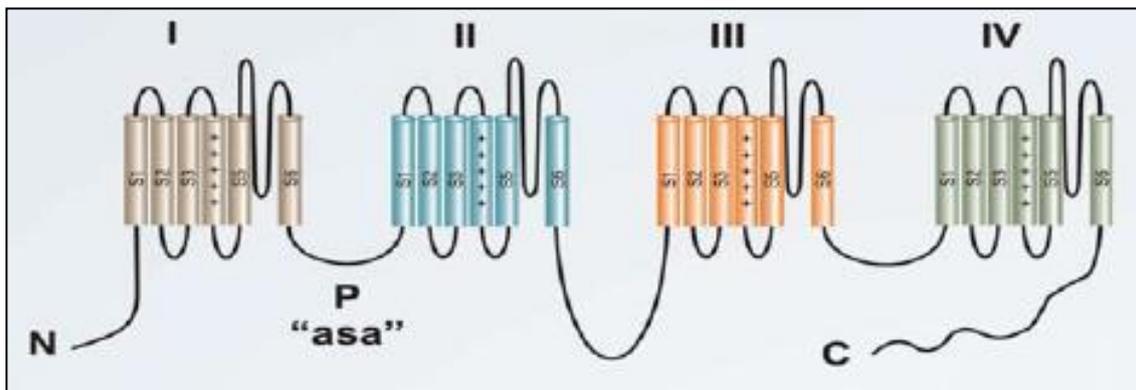


Figura 6. Estructura lineal del Canal de Ca^{2+} tipo L. Este canal está formado por cuatro dominios (I, II, III, IV) conectados por segmentos intracelulares. Cada uno de los dominios, a su vez, está formado por seis segmentos transmembrana (S1 a S6) conectados por segmentos intracelulares y extracelulares. Tanto el extremo amino (N) como el carboxílico (C) son intracelulares (Modificado de Cingolani y Houssay, Cap 3., 2002).

1.2.6. Receptores de Rianodina

Los receptores de rianodina (RyR) son estructuras ubicadas en el RS, enfrentando los túbulos T como así también entre las cisternas subsarcolemales, enfrentando al sarcolema. Fueron descriptos inicialmente como “pies” ya que hacen protrusión en el citoplasma (Franzini-Armstrong y col., 1999). Reciben este nombre debido a la gran afinidad que presentan con el alcaloide rianodina. Se conocen tres tipos diferentes de RyR: RyR1, expresado en músculo esquelético principalmente, RyR2, en

músculo cardíaco y RyR3, expresado en músculo liso y tejidos no musculares. En el presente trabajo de Tesis nos referiremos exclusivamente a los RyR2.

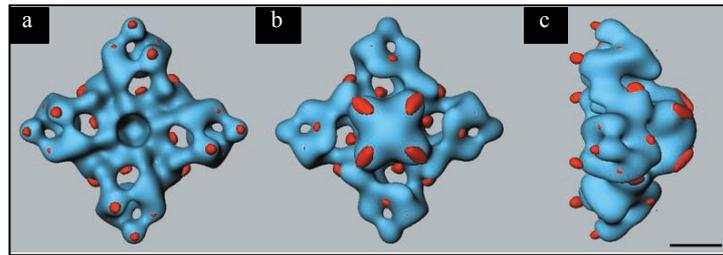


Figura 7. Estructura tridimensional del RyR2. a. Vista desde el túbulo T. b. Vista desde el RS. c. Vista lateral (Modificado de Sharma y col., 2000).

Los RyR2, (Figura 7), también son identificados bajo el nombre de “canales liberadores de Ca^{2+} del RS”. Están conformados por 4 unidades polipeptídicas que dan lugar al dominio citoplasmático (“pie”). La porción que forma el canal del RyR2 está constituida por una pequeña porción transmembrana.

El RyR2 posee diferentes sitios de unión para diferentes ligandos que regulan la función de este canal, así, por ejemplo existe un sitio específico para el Ca^{2+} y uno para rianodina también. Además, cada unidad del RyR2 está asociada a una enzima denominada Calstabin2 (también se la conoce comoFKBP12.6 por ser capaz de ligarse a una droga inmunosupresora denominada FK506) que regula su actividad estabilizando el estado cerrado del canal. La regulación del RyR2 se describirá con más detalle en el capítulo siguiente.

1.2.7. Calsecuestrina (CSQ)

La calsecuestrina es una proteína que se encuentra en el interior del RS principalmente a nivel de las cisternas laterales del mismo. Su función es la de acoplarse al Ca^{2+} y “amortiguar” el Ca^{2+} libre dentro del RS, y actuar tanto como amortiguador y regulador directo del proceso de liberación de Ca^{2+} .

1.2.8. Bomba de Ca^{2+} del RS o SR- Ca^{2+} -ATPasa (SERCA).

Esta bomba se encuentra entre las ATPasas movilizadoras de iones denominadas del tipo “P” al igual que la bomba Na^+/K^+ y la ATPasa del sarcolema (PMCA). Utiliza la energía liberada por la hidrólisis del ATP para movilizar al Ca^{2+} del citosol. La “P” denota que en este tipo de bombas existe un paso clave donde se forman intermediarios fosforilados con dos conformaciones (E1-E2). La SERCA cumple con la función de recapturar activamente Ca^{2+} desde el citosol hacia el RS. Se encuentra en la membrana del RS. Se conocen 5 isoformas de esta bomba codificadas por 3 genes. La bomba del

tejido cardíaco se denomina SERCA2a (también se la encuentra en el tejido muscular esquelético lento). Posee una secuencia parecida a la de la subunidad α de la bomba Na^+/K^+ que se describirá más adelante. En esta isoforma, la velocidad de transporte es regulada por una proteína inhibitoria llamada fosfolamban (PLN) (Tada y col., 1974).

1.2.9. Fosfolamban (PLN)

Como se mencionó anteriormente esta proteína es la encargada de controlar la celeridad de recaptura de Ca^{2+} por parte de la SERCA2a.

La PLN es una fosfoproteína compuesta por 52 aminoácidos que en su estado desfosforilado inhibe a la SERCA2a (reduciendo la afinidad aparente de la SERCA2a por el Ca^{2+}), disminuyendo así, la recaptura de Ca^{2+} por el RS.

La fosforilación de PLN libera esta inhibición. Esta proteína puede ser fosforilada *in vitro* en tres sitios diferentes: Ser^{16} por proteínas quinasas dependientes de GMP y AMP cíclico (PKG y PKA, respectivamente), Thr^{17} por la CaMKII, y Ser^{10} por la proteína quinasa C (PKC). Se ha demostrado que la fosforilación en los sitios Thr^{17} y Ser^{16} son mediadores clave en los efectos inotrópicos positivos y relajantes de la estimulación β_1 adrenérgica en el corazón intacto subrayando su importancia fisiológica (Drago y col., 1994; Mundiña-Weilenmann y col., 1996; Zhao y col., 2004) (Figura 8).

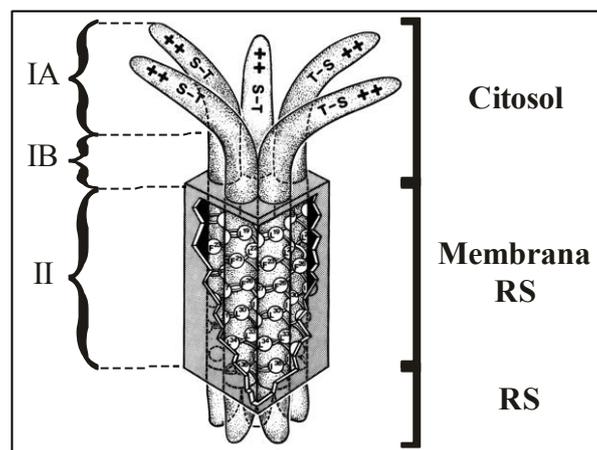


Figura 8. Modelo estructural de la proteína fosfolamban. El dominio I se extiende sobre la membrana del RS e incluye a los sitios de fosforilación: Ser^{16} y Thr^{17} . El dominio IA abarca los residuos 1 al 20 y el dominio IB desde el 21 al 29. El dominio II es transmembrana y abarca los residuos 30 a 52. Éste interacciona con los monómeros adyacentes para dar lugar a una estructura pentamérica estable (Figura adaptada de Simmerman y col., 1998).

1.2.10. ATPasa del sarcolema (PMCA)

Al igual que la bomba Na^+/K^+ y la SERCA, la PMCA es una ATPasa del tipo “P”. El peso molecular de la misma es de 100kDa y es inhibida por el vanadato y el lantano. Se conocen 4 isoformas de esta bomba (PMCA1-4). Es activada por el complejo formado por Ca^{2+} y Calmodulina. La PMCA es un polipéptido que atraviesa la bicapa lipídica diez veces y cuyas regiones hidrofílicas se encuentran en el citoplasma, diferenciándose tres grandes bloques además de los extremos C y N terminal. El primer bloque contiene el sitio fosfatasa y la región de unión de los fosfolípidos. El segundo bloque, el de mayor tamaño, posee el sitio de unión del ATP y el tercer dominio es la región C terminal donde se une la CaM. En las regiones sobre la membrana (regiones 4, 5, 6 y 8), se encuentra el sitio de unión para el Ca^{2+} (Velandía y col., 2001). La CaM actúa sobre la bomba aumentando la afinidad de la misma por el Ca^{2+} y aumentando la velocidad de transporte de Ca^{2+} (Carafoli y col., 1994). El porcentaje de Ca^{2+} expulsado de la célula a través de la misma varía en las diferentes especies (Bers, 2002).

1.2.11. Bomba Na^+/K^+

Como se mencionó anteriormente pertenece al subgrupo de las ATPasas del tipo “P”. Está formada por una subunidad α de 112 kDa y posee un único punto de inserción en la membrana. En ésta se hallan los sitios de unión del Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , fosforo inorgánico (Pi) y ATP (también aquí es donde se fijan los glucósidos digitálicos que son inhibidores específicos de la misma). La otra subunidad que forma parte de esta bomba es la β , con su mayor proporción del lado citoplasmático

En condiciones fisiológicas esta bomba extruye 3 iones Na^+ e introduce 2 iones K^+ por cada ATP hidrolizado, produciendo un efecto hiperpolarizante debido al transporte neto de una carga positiva hacia afuera en cada ciclo. Esto da lugar a que el potencial de membrana sea 2-3 milivoltios más negativo de lo que debería ser por su potencial de equilibrio para los iones a ambos lados de la membrana plasmática. Existe una diferencia fundamental entre los sitios de unión para el K^+ y para el Na^+ . Mientras los primeros pueden ser ocupados por otros iones con igual carga, como ser Rb^+ , Cs^+ , Li^+ , Na^+ , NH_4^+ o TI^+ (que de alguna manera “engañan” a la bomba), los sitios de Na^+ (intracelulares) son mucho más selectivos. A concentraciones fisiológicas, el 50% de los sitios para el Na^+ están ocupados y el 70% de los sitios de K^+ también lo están. Un activador de la bomba es el aumento de Na^+ intracelular y un inhibidor es la disminución del ATP. La expulsión de Na^+ desde el interior de la célula es fundamental para el mantenimiento del equilibrio osmótico y el volumen celular. Este transportador es clave en el establecimiento del gradiente iónico sarcolemal tanto para el Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y por consecuencia permite el funcionamiento de los canales iónicos (Bers, 2001).

1.2.12. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

El NCX es una proteína transmembrana de 110 kDa formada por 970 aminoácidos. Posee varios segmentos de carácter hidrofóbicos que forman dominios transmembrana y uno de mayor tamaño cuya función sería la regulación del transportador. Existen tres isoformas: NCX1, NCX2 y NCX3. La primera es la que abunda en el corazón, en el músculo liso y riñón. Las otras dos isoformas se han encontrado en cerebro y músculo esquelético (Figura 9).

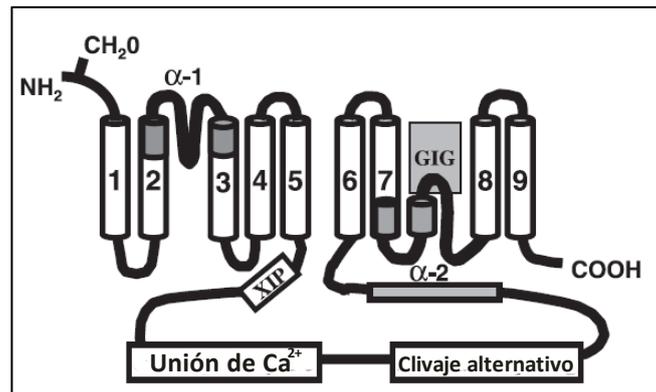


Figura 9. Diagrama del intercambiador NCX. El modelo posee 9 dominios transmembrana, una región XIP (péptido inhibidor de intercambio) endógena, un sitio de unión para la regulación del Ca^{2+} y una región en donde ocurre el clivaje alternativo. GIG: motivo de glicina-isoleucina-glicina (Modificado de Marshall y col., 2005).

El Ca^{2+} que ingresa como señal para el AEC debe ser extruido de alguna forma para mantener el balance de Ca^{2+} de la célula. La ATPasa del sarcolema no es suficiente para tal fin y se ha demostrado que la capacidad que poseen las células para expulsar el Ca^{2+} se debe a que expresan este intercambiador en su membrana plasmática que acopla la expulsión de un ion Ca^{2+} por la entrada de tres iones Na^+ . Este intercambio ($3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) es por lo tanto electrogénico y su fuerza impulsora depende del potencial de membrana y de la concentración de Na^+ y Ca^{2+} a ambos lados de la membrana.

Cuando el intercambiador trabaja sacando Ca^{2+} e ingresando Na^+ se dice que lo hace en su modo directo, ayudando a la remoción del Ca^{2+} citosólico, pero también puede trabajar intercambiando Na^+ intracelular por Ca^{2+} extracelular, trabajando en su modo inverso, induciendo el ingreso de Ca^{2+} . El potencial de equilibrio del NCX es negativo y generalmente mayor a -30mV ; por lo tanto cerca del potencial de reposo trabaja en su modo directo dando lugar a una corriente despolarizante ($I_{\text{Na/Ca}}$). Cuando se exagera esta corriente, a la que nos referimos en la Introducción, por aumento de la pérdida de Ca^{2+} del RS, pueden generarse arritmias. Cuando el NCX trabaja en su modo inverso da lugar a una corriente repolarizante promoviendo la entrada de Ca^{2+} en la célula durante la fase 1 y 2

del PA. Esta entrada, es, sin embargo muy poco importante para el AEC. La $I_{Na/Ca}$ vuelve a ser despolarizante (modo directo) durante el resto de la fase 2 y durante la fase 3 del PA (Figura 10).

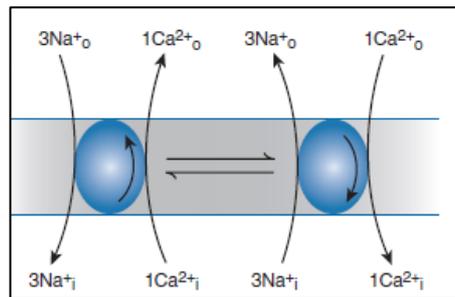


Figura 10. Intercambiador NCX. Modo directo e inverso (Tomado de Blaustein y col., 2012).

2. EL APARATO CONTRÁCTIL

2.1. EL SARCÓMERO Y LAS PROTEÍNAS CONTRÁCTILES

Al observar las células musculares bajo microscopía se ve que presentan bandas transversales claras y oscuras dispuestas transversalmente de manera alternada. De esta particularidad deriva el nombre de músculo estriado (tanto para el músculo cardíaco como para el esquelético). Esta sucesión de bandas parece continua pero se halla sólo en elementos independientes denominadas *miofibrillas* que se encuentran a lo largo del citoplasma. Las miofibrillas forman el aparato contráctil del músculo y son las efectoras finales del AEC. La estriación que muestran las miofibrillas se debe a la repetición a lo largo de las mismas de la unidad contráctil del músculo, es decir el *sarcómero*. A su vez cada sarcómero está compuesto por filamentos finos y gruesos interdigitados entre sí (Figura 11).

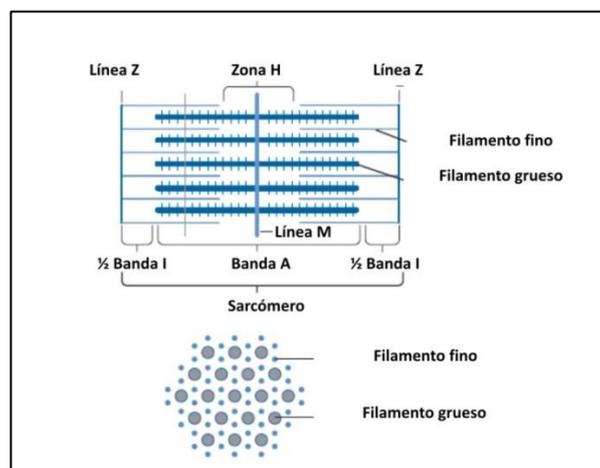


Figura 11. Esquema del sarcómero y disposición espacial de los filamentos gruesos y finos (Tomado de Blaustein y col., 2012).

El filamento grueso está compuesto por miosina y posee una longitud de 1,55 μm . La miosina es una proteína que tiene forma de bastoncito. Su cola se orienta hacia el centro del filamento y la cabeza de forma globular y flexible se extiende fuera de él. La cabeza de la miosina tiene actividad ATPasa y forma la base molecular del puente cruzado o transversal. En la cabeza, la miosina posee dos pares de cadenas livianas: una, es el par de cadenas livianas esenciales (MLC17) y el otro par, son las cadenas livianas regulatorias (MLC20). La fosforilación de éstas tiene un rol importante en la cinética de los puentes cruzados (Figura 12).

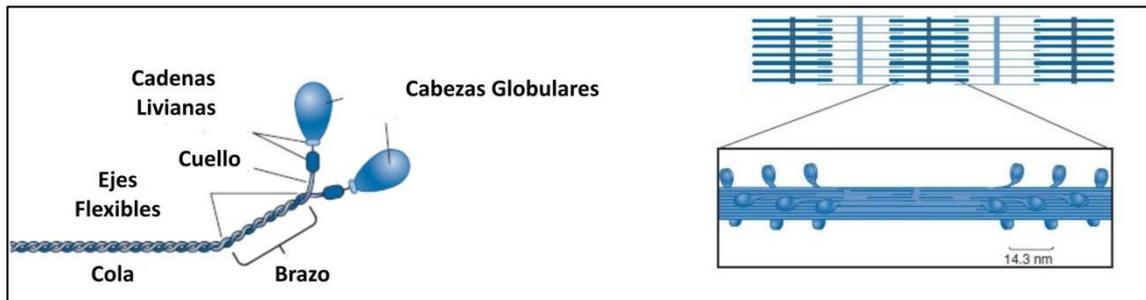


Figura 12. Esquema de la estructura de la miosina (panel izquierdo) y del filamento grueso de miosina (panel derecho). En la parte superior del panel derecho se muestra el esquema de la estructura del sarcómero, debajo la estructura propuesta para el filamento grueso de miosina (Tomado de Blaustein y col., 2012).

Por otro lado los filamentos finos están formados principalmente por la proteína actina. También los componen otras dos proteínas: la troponina y la tropomiosina, fundamentales en la regulación de la contracción muscular. Tienen una longitud de $1\mu\text{m}$ y se extienden desde las llamadas líneas Z del sarcómero (que constituyen su límite), hacia el centro. Las moléculas de actina se ordenan en cadenas enroscadas entre sí helicoidalmente y forman el cuerpo del filamento fino. La actina posee la propiedad de interactuar con la miosina y la de activar su actividad de ATPasa (de ahí su nombre). Las moléculas de tropomiosina son largas y delgadas y se unen entre sí, extremo con extremo, dando lugar a un filamento que se extiende a lo largo del filamento fino en el hueco que se genera cuando se enroscan entre sí dos filamentos de actina.

Una molécula de tropomiosina se extiende sobre siete monómeros de actina. A su vez cada siete moléculas de actina (por ende cada una de tropomiosina), hay un complejo de troponina. Éste está formado por tres elementos: la troponina T, la I y la C (TnT, TnI y TnC respectivamente). La troponina T es la que une el complejo de troponina con la tropomiosina, la I inhibe la interacción entre la actina y la miosina junto con la tropomiosina y la C es la que tiene la capacidad de ligarse al Ca^{2+} (Figura 13).

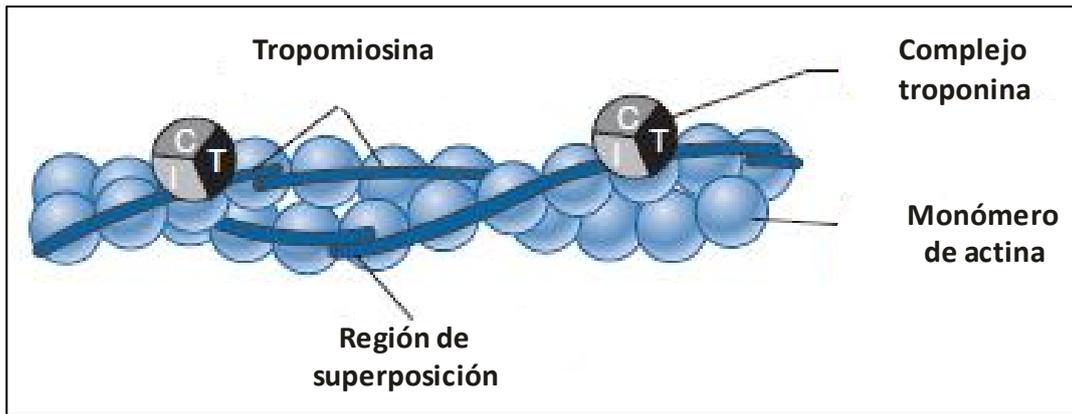


Figura 13. Esquema del filamento fino de actina y proteínas asociadas. I: Troponina I, T, troponina T y C, troponina C (Tomado de Blaustein y col., 2012).

Existen además de las proteínas contráctiles y regulatorias nombradas, otras proteínas asociadas al sarcómero como la proteína M, la miomesina, la tropomodulina, la titina (o conectina) y la nebulina que forman los filamentos de titina y nebulina (Figura 14). Cada molécula de titina se extiende a lo largo del filamento que lleva el mismo nombre desde la línea Z a la línea M, dando lugar a un tercer filamento en el sarcómero, además de la actina y la miosina. Cada filamento de titina sitúa a la miosina en el centro del sarcómero y lo ancla a la banda Z. Posee propiedades elásticas que explican en gran parte la relación que existe en reposo entre la tensión y longitud del músculo estriado (tensión diastólica en el músculo cardíaco). La titina provee estabilidad a los sarcómeros en la rama descendente de la relación fuerza-longitud y para los filamentos de miosina en la mitad del sarcómero. Cuando se elimina la titina, toda la transmisión de fuerza, ya sea activa o pasiva a lo largo del sarcómero, se pierde (Herzog y col., 2015).

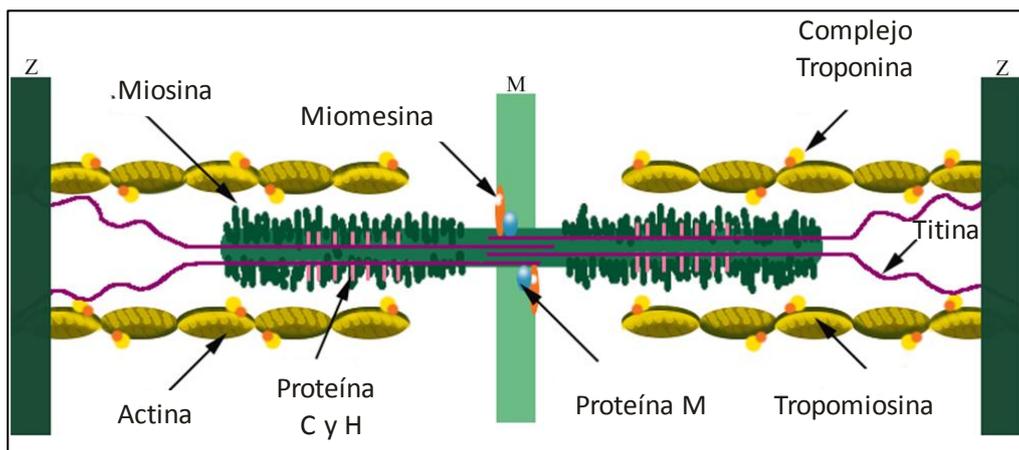


Figura 14. Principales proteínas que componen el sarcómero (Adaptado de Bers, 2002).

3. CICLO AEC

Como se mencionó más arriba el AEC es el conjunto de eventos que comienzan con un estímulo en la membrana plasmática y que finalizan con el aumento del Ca^{2+} citosólico con la consecuente contracción muscular. Si la intensidad del estímulo antes mencionado es suficiente, el resultado del mismo es la despolarización de la membrana celular, la entrada de Ca^{2+} y la liberación de más Ca^{2+} por el RS (CICR), resultando esto en el aumento del Ca^{2+} citosólico que pasa de un valor basal de 10^{-7} mol/l aproximadamente a 10^{-5} mol/l, y la contracción muscular. De esta manera el Ca^{2+} es el acoplador entre la excitación y la contracción (Figura 15).

El Ca^{2+} se une a la TnC y genera la contracción muscular. La mayor parte del Ca^{2+} es recaptado por el RS con la utilización de energía proveniente del ATP para su posterior liberación ante un nuevo PA. Cuando baja el nivel de Ca^{2+} por la recaptura de Ca^{2+} por el RS, el Ca^{2+} unido a la TnC se desprende de la misma y se produce la relajación.

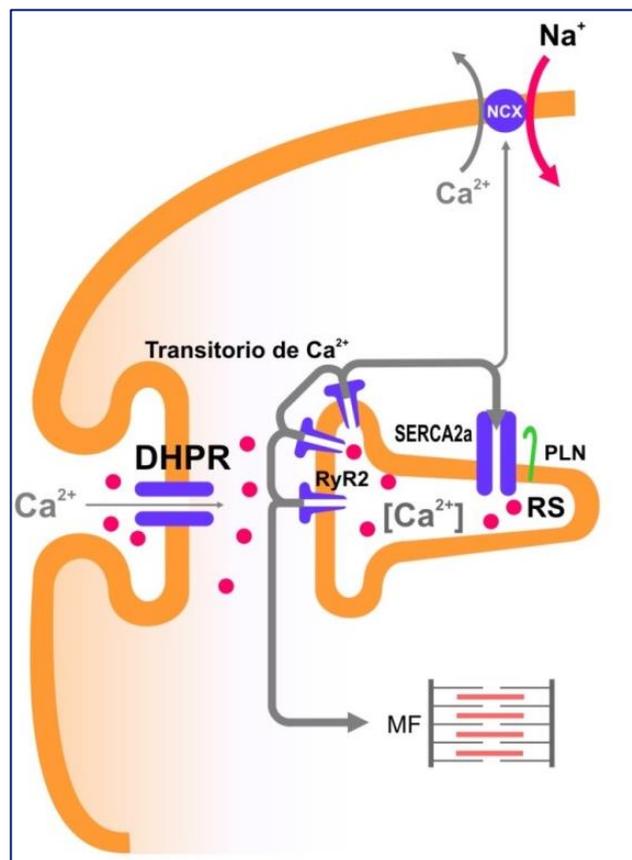


Figura 15.AEC. El Ca^{2+} que ingresa por los canales de Ca^{2+} tipo L (DHPR) durante la despolarización, libera una cantidad aún mayor de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) que provee la mayor parte del Ca^{2+} para la activación de los miofilamentos. Durante la relajación el Ca^{2+} liberado por el RS es recapturado por la bomba de Ca^{2+} del RS, la SERCA2, y el Ca^{2+} que ingresó por los canales L, es extruido por el intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).

Como se describió más arriba, la troponina y la tropomiosina cumplen un papel de regulación del proceso de contracción impidiendo la interacción entre la actina y la miosina. El responsable de la desinhibición es el Ca^{2+} . Cuando el músculo está en reposo o relajado, el complejo que forma la troponina y la tropomiosina cubre físicamente el sitio activo de la actina bloqueando la interacción entre ésta y la miosina. Cuando ocurre la excitación con el consiguiente aumento del Ca^{2+} dentro de la célula, éste se une a la troponina C. Esta unión genera un cambio en el complejo troponina-tropomiosina que hace que esta última se desplace. Este corrimiento libera el bloqueo del sitio activo de la actina permitiendo que se una a la miosina. Cuando la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma baja, el músculo vuelve a su estado de relajación (Figura 16). Con esto se pone de manifiesto el rol del Ca^{2+} : libera el bloqueo preexistente entre la actina y la miosina. El aumento de la fuerza activa resulta de un mayor reclutamiento de puentes que ciclan activamente, sin cambios en la cinética de esos puentes (Bers, 2001).

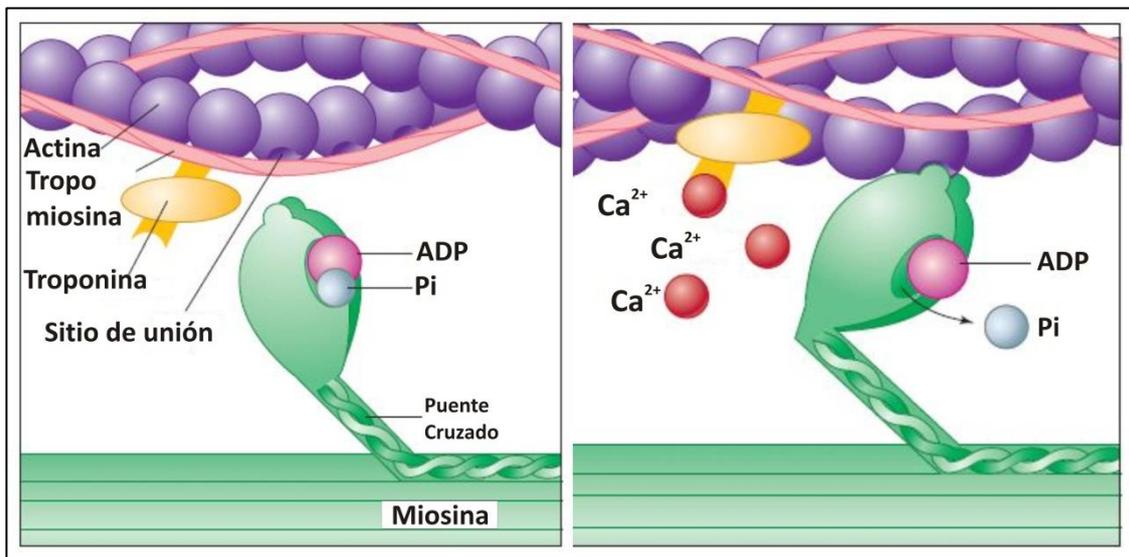


Figura 16. Rol del Ca^{2+} en el AEC (Adaptado de Fox, 2013).

II. REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE INTERVIENEN EN EL AEC

En el capítulo anterior se describieron las proteínas que intervienen en el AEC. En este apartado nos ocuparemos de detallar los mecanismos por los cuales dichas proteínas son reguladas. Las proteínas que manejan el Ca^{2+} y el AEC están altamente reguladas por diferentes mecanismos entre los cuales pueden mencionarse la fosforilación, la oxidoreducción y la nitrosilación.

1. CAMKII Y PKA.

En el capítulo anterior, ya hemos mencionado algunas de las quinasas que intervienen fosforilando proteínas del AEC. En este capítulo describiremos las fosforilaciones de mayor importancia en relación al tema de este trabajo de Tesis. Nos referiremos especialmente a dos quinasas cuyos efectos tienen relación con el AEC y los mecanismos de arritmias: la quinasa dependiente de Ca^{2+} y CaM (CaMKII) y la proteína quinasa dependiente del adenosínmonofosfato cíclico (AMPc), denominada PKA.

1.1. CAMKII

La CaMKII, al igual que la PKA, regula casi la mayoría de los componentes relacionados con el AEC. En estado de reposo la CaMKII se encuentra inhibida por el dominio autoinhibitorio que se comporta como un pseudosustrato, previniendo que los sustratos se unan a ella (Hudmon y col., 2002; Maier y col., 2002). La autofosforilación en este sitio da como resultado una forma activa autónoma de la CaMKII (aún luego de la disociación de Ca^{2+} y CaM) e incrementa la afinidad del complejo quinasa – CaM. (Schulman y col., 1992). La CaMKII permanece completamente activa con la CaM unida, independientemente del nivel del Ca^{2+} intracelular y entre un 20% y 80% activa luego de su disociación de la CaM (Figura 17). Más recientemente se ha descrito que la CaMKII se activa también por radicales libres del O_2 (ROS) (Erickson y col., 2008; Palomeque y col., 2009).

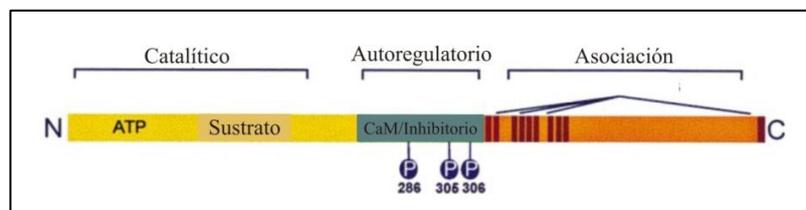


Figura 17. Diagrama lineal de una subunidad de CaMKII (Modificado de Hudmon y col., 2002).

La CaMKII fosforila entre otras proteínas, al canal de Ca^{2+} tipo L, a la PLN y a los RyR2 (Figura 18).

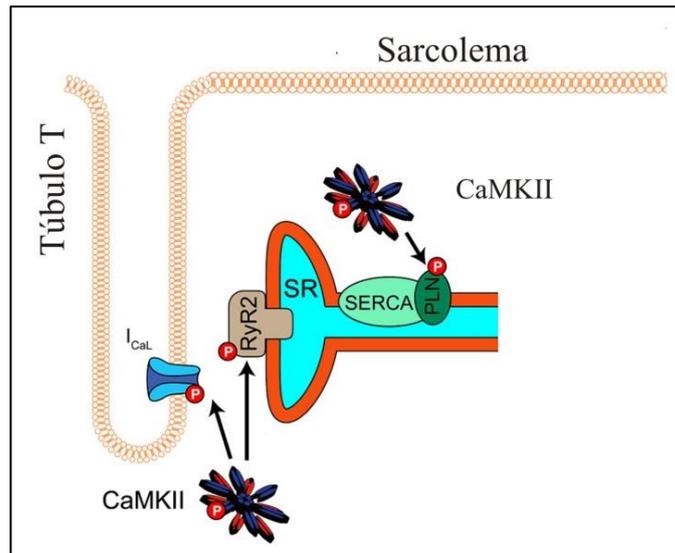


Figura 18. Fosforilación de las proteínas del AEC por CaMKII (Modificada de Vincent y col., 2014).

1.2. PKA

La PKA se activa fisiológicamente por estimulación simpática del corazón a través de los receptores β adrenérgicos. La estimulación de los receptores β adrenérgicos activa una proteína de unión al GTP, la proteína G estimuladora, G_s , que estimula a la adenilato ciclasa (ADC) para producir AMPc, que a su vez activa a la PKA. Esta quinasa fosforila varias proteínas relacionadas con el AEC (PLN, canales de Ca^{2+} tipo L, RyR2, troponina I y la proteína C de unión a la miosina). La fosforilación de las mismas es la principal responsable de los efectos inotrópico positivo y relajante de los agentes β_1 adrenérgicos. La estimulación de los canales de Ca^{2+} tipo L y de la PLN por PKA aumenta el Ca^{2+} intracelular y produce la activación de CaMKII, por lo que los efectos de la estimulación β_1 adrenérgica se deben a la activación de ambas quinastas. En la Figura 19 se resumen los mecanismos de fosforilación por PKA y CaMKII, producidos por estimulación β_1 adrenérgica.

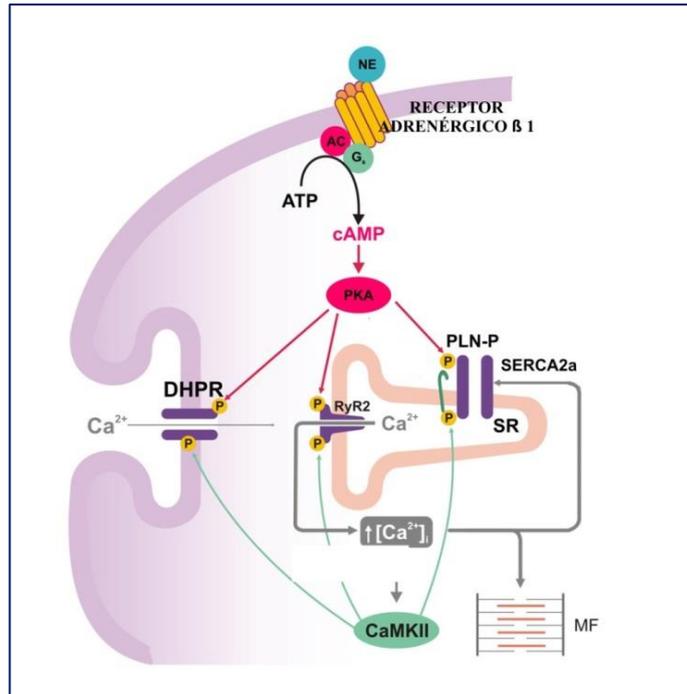


Figura 19. Fosforilación de las proteínas del AEC por estimulación β_1 adrenérgica. AC: adenilato ciclasa, Gs: proteína G estimuladora, cAMP: AMP cíclico, PKA: proteína quinasa A. El aumento de Ca^{2+} producido por activación de PKA activa a CaMKII (Figura modificada de Mattiazzi y col., 2014).

2. REGULACIÓN DE LOS CANALES DE Ca^{2+} TIPO L.

2.1. REGULACIÓN DE LOS CANALES DE Ca^{2+} TIPO L POR CaMKII

La fosforilación por CaMKII de los canales tipo L provoca una facilitación de la corriente de Ca^{2+} ($I_{Ca,L}$) a través de los mismos, que típicamente se observa como una corriente de amplitud aumentada y de inactivación lenta (Xiao y col., 1994; Yuan y col., 1994; Wu y col., 2001) Esta escalera positiva de $I_{Ca,L}$ es dependiente de Ca^{2+} y de CaMKII ya que este efecto se puede abolir con el uso de péptidos inhibidores de CaMKII.

2.2. REGULACIÓN DE LOS CANALES DE Ca^{2+} TIPO L POR PKA

La fosforilación dependiente de PKA del canal de Ca^{2+} tipo L aumenta la $I_{Ca,L}$ a través de la generación de un cambio en el E_m al cual se activa el canal, provocando que se active a valores más negativos. Esto acarrea un aumento en la corriente de Ca^{2+} y del influjo de Ca^{2+} a la célula durante cada despolarización. También produce una inactivación más rápida de la $I_{Ca,L}$ (debido al mayor influjo y liberación de Ca^{2+}) (Bers, 2008). Esta fosforilación da lugar a un incremento en el contenido de Ca^{2+} del RS y de Ca^{2+} liberado por el mismo (Terentyev y col., 2003).

Aunque no nos ocuparemos aquí de otras regulaciones, es importante mencionar que los canales de Ca^{2+} tipo L también son regulados por PKC en el sitio Ser¹⁹²⁸ (Yang y col., 2005) y regulados por ROS (Mikami y col., 1989).

3. REGULACIÓN DE PLN

3.1. REGULACIÓN POR CaMKII Y PKA

Tal como se mencionó en el primer capítulo de este trabajo, la fosforilación de PLN ocurre *in vitro* por CaMKII en el residuo Thr¹⁷, por PKA en el residuo Ser¹⁶ y por PKC en el residuo Ser¹⁰. Fisiológicamente, las fosforilaciones más importantes son las mediadas por CaMKII y PKA (MacLennan, D. H. & Kranias, E. G., 2003). La fosforilación en los residuos mencionados induce un aumento en la actividad de la SERCA2a y de la velocidad de la recaptura de Ca^{2+} por el RS (Tada y col., 1983)¹. Esto a su vez genera un aumento en la velocidad de la relajación, de la carga de Ca^{2+} del RS y de la liberación de este ion que en conjunto con la fosforilación de los canales de Ca^{2+} tipo L y posiblemente de los RyR2, intervienen en el aumento de la contractilidad que se observa por estimulación β_1 -adrenérgica (Kuschel y col., 1999).

Gustavsson y colaboradores utilizaron espectroscopia de resonancia magnética nuclear de estado sólido para estudiar la interacción física entre la SERCA2a y la PLN fosforilada y desfosforilada en bicapas de membrana. Se encontró que la regulación alostérica de la SERCA2a depende del equilibrio conformacional de la PLN, cuyo dominio regulatorio citoplasmático se interconvierte entre tres estados diferentes: un estado base T (helicoidal y asociado a la membrana), un estado excitado R (desplegado y desprendido de la membrana) y un estado B, no inhibitorio (extendido) (Figura 20) (Gustavsson y col., 2013).

¹ Algunos estudios demostraron que la fosforilación directa de SERCA2a por CaMKII estimula su actividad (Xu y col., 1999), sin embargo otros estudios no han podido demostrar la función estimuladora significativa de CaMKII sobre la SERCA2a (Reddy y col., 1996; Valverde y col., 2005).

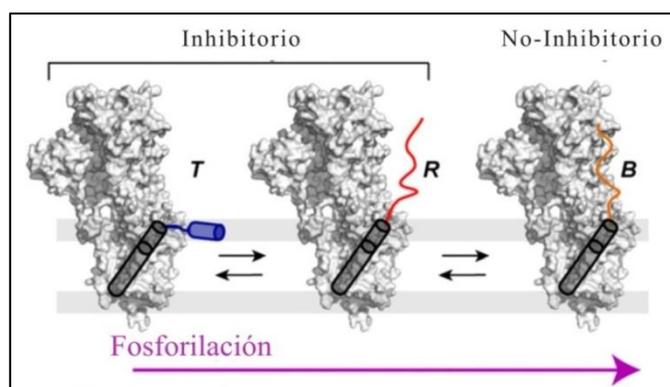


Figura 20. Modelo de regulación alostérica de la SERCA2a por la PLN. Equilibrio conformacional de PLN unida a SERCA con estados inhibitorios T y R y el estado no inhibitorio B. La fosforilación mueve el equilibrio hacia el estado B no inhibitorio (Modificado de Gustavsson y col., 2013).

3.2. DESFOSFORILACIÓN DE LA PLN

La desfosforilación de la PLN está mediada por la fosfatasa tipo 1 asociada al RS, PP1, y revierte la activación de la SERCA2a por la PLN fosforilada y los efectos estimuladores de los agonistas β_1 (Vittone y col., 1990; MacDougall y col., 1991). A su vez, PP1 está modulada por sus inhibidores endógenos, el inhibidor 1 (I-1) y el inhibidor 2 (I-2). El I-1 se activa por fosforilación por PKA inhibiendo a PP1 y amplificando los efectos estimuladores de la estimulación β_1 -adrenérgica. Por último, se ha descrito una proteína, la Hsp20, que inhibe la actividad enzimática de la PP1, disminuyendo la inhibición de la PLN y aumentando la función cardíaca (Kranias, 1985).

Es interesante mencionar que, debido a que la PLN desfosforilada inhibe a la SERCA2a y por lo tanto la recaptura de Ca^{2+} , la ablación de PLN libera dicha inhibición (como su fosforilación), aumentando así la velocidad de relajación y la contractilidad. Esto se demostró en animales transgénicos carentes de PLN (PLNKO), a través de los cuales se probó que la PLN ejercía realmente una función inhibitoria sobre la SERCA2a y no de activación como se pensaba (Luo y col., 1994).

Recientemente se ha descrito una compleja regulación de PLN por otras proteínas además de los procesos de fosforilación/desfosforilación mencionados. La Hax-1 es una proteína que aumenta la inhibición por PLN del ciclado de Ca^{2+} del RS y de la contractilidad cardíaca *in vivo* mientras que la estimulación β_1 -adrenérgica libera esta inhibición (Zhao y col., 2009). Adicionalmente se ha demostrado que el nitroxilo (HNO) puede provocar una oligomerización de la PLN por la formación de unión disulfuro. Esto libera la inhibición de la SERCA2a mediada por la PLN y debido a un incremento en la función de la misma hay un efecto inotrópico y lusitrópico positivo que se opone a la inhibición directa de la SERCA2a por modificaciones redox producidas por compuestos basados en oxígeno (Sivakumaran y col., 2013)

4. REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE RIANODINA TIPO2

El RyR2 es tanto un canal liberador de Ca^{2+} del RS como también una proteína de andamiaje sobre la que se localizan numerosas proteínas regulatorias claves. Éstas incluyen: CaM, que ejerce una modulación dependiente de Ca^{2+} sobre la función del RyR2; la proteína FKBP-12.6o calstabin2, la cual ha sido implicada en la estabilización de la liberación de Ca^{2+} por el RyR2 y también en el acoplamiento de la liberación de Ca^{2+} tanto de los RyR2 individuales como de los tetrámeros adyacentes (Marx y col., 2000); PKA, que actuaría aumentando la P_o del RyR2 (aunque este resultado es muy controvertido); las fosfatasa 1 y 2, que actúan desfosforilando a los RyR2 y la sorcina, que se une a los RyR2 y a los canales de Ca^{2+} tipo L. Los RyR2s también se encuentran unidos a otras proteínas a nivel luminal: triadina, juntina y calsecuestrina. Estas proteínas participan en la amortiguación del Ca^{2+} intra RS y en la modulación del proceso de la liberación de Ca^{2+} . Los RyR2 forman un gran complejo funcional de liberación de Ca^{2+} denominado couplón, formado por un conjunto de RyR2 (más de 100 RyR2), canales de Ca^{2+} tipo L (enfrentados a nivel de los túbulos T) y el espacio subsarcolemal entre ellos.

4.1. REGULACIÓN DEL RYR2 POR FOSFORILACIÓN.

4.1.1. Dependientes de CaMKII.

Se ha demostrado que la CaMKII también co- inmunoprecipita con RyR2 y que además puede alterar su actividad (Bers y col., 2005; Ferrero y col., 2007). Existe controversia sobre los sitios específicos en los cuales CaMKII fosforila a los RyR2. Witcher y colaboradores (Witcher y col., 1991) reportaron que el único sitio fosforilable de RyR2 era Ser^{2809} que regula la actividad del canal. Rodríguez y colaboradores (Rodríguez y col., 2003) mostraron que la CaMKII fosforila al RyR2 con una estequiometría 4 veces mayor que lo que lo hace PKA, sugiriendo que existen otros sitios, además de Ser^{2809} que son blanco de CaMKII y que podrían ser mediadores críticos de efectos funcionales. Luego, Wehrens y colaboradores identificaron al sitio Ser^{2814} como fosforilable por CaMKII en el RyR2 (Wehrens y col., 2004). También se reportó al sitio Ser^{2030} usando mapeo de fosfo-epítopes. Aunque este sitio cae dentro del consenso de fosforilación por CaMKII ($^{2027}\text{R-L-L-S}^{2030}$) es fosforilado, al menos *in vitro*, por PKA (Brien y col., 2015).

La mayoría de los estudios se realizaron en sistemas aislados, incluyendo registros de canales únicos y vesículas de RS, y éstos demostraron que CaMKII aumenta la P_o de los RyR2 y el “binding” (unión) de Ca^{2+} a las membranas del RS (Witcher y col., 1991; Hain y col., 1995; Wehrens y col., 2004; Ferrero y col., 2007). A pesar de esto Valdivia y colaboradores encontraron que la fosforilación de CaMKII disminuye la P_o de los RyR2 (Lokuta y col., 1995). Adicionalmente se realizaron estudios del RyR2

en su ambiente celular nativo. La sobreexpresión de CaMKII δ_C en ratones transgénicos produjo un aumento de la liberación fraccional de Ca²⁺ del RS, y la frecuencia de chispas de Ca²⁺ del RS en reposo aumentó dramáticamente a pesar de una carga de Ca²⁺ del RS más baja y una concentración menor de Ca²⁺ citosólico en diástole (Maier y col., 2003). van Oort y colaboradores demostraron en un modelo de ratón con sensibilidad aumentada del RyR2 al Ca²⁺ citosólico por pseudo fosforilación constitutiva del sitio Ser²⁸¹⁴ en el RyR2 (reemplazo de la serina 2814 por ácido aspártico, cepa S2814D), que poseen un aumento en la pérdida de Ca²⁺ por el RS, dando apoyo a los resultados mencionados anteriormente que demostraban que la fosforilación de CaMKII aumenta la P_o de los RyR2 (Van Oort y col., 2010).

4.1.2. Dependientes de PKA

La PKA actúa modulando la P_o de los canales de RyR2. En registros de canales únicos aislados, la fosforilación mediada por PKA incrementó la apertura inicial de RyR2 durante un incremento abrupto de la concentración de Ca²⁺ citosólica, pero disminuyó la P_o en estado estacionario a una dada concentración de Ca²⁺ (Valdivia y col., 1995). En contraste, Marx y su grupo (Marx y col., 2000) hallaron que la activación de PKA aumenta la P_o en estado estacionario de canales de RyR2 únicos en bicapas y atribuyeron esto al desplazamiento de FKBP-12.6 del RyR2. Aún más, en la insuficiencia cardíaca encontraron un estado hiperfosforilado de los RyR2, lo cual podría generar una pérdida diastólica de Ca²⁺ del RS y contribuir a un contenido de Ca²⁺ de RS disminuido en esta patología. Pero en sistemas celulares más intactos, no se detectaron efectos de fosforilación de RyR2 dependientes de PKA sobre la pérdida de Ca²⁺ en reposo (como chispas de Ca²⁺) en ausencia de PLN (sin cambio en la carga de Ca²⁺ del RS) (Li y col., 2002). La fosforilación de los RyR2 también puede alterar la respuesta intrínseca de la liberación de Ca²⁺ del RS ante una señal disparadora de I_{Ca,L}, pero los resultados respecto a esto son dispares, mostrando tanto un incremento, como una disminución o falta de cambio en la misma (Viatchenko-Karpinski y col., 2001; Ginsburg y col., 2005). De este modo, si la fosforilación dependiente de PKA afecta el comportamiento de los RyR2 durante el reposo o el AEC aún permanece controversial, aunque la mayoría de los autores acepta que no la afecta.

A modo de resumen, en la Figura 21 se ilustran los sitios de fosforilación, enfatizándose el concepto de “zonas calientes” de fosforilación del RyR2 (“*hot spots*”) que se refiere a bucles citoplasmáticos que contienen sitios de fosforilación que se encuentran en la cara externa del canal. En dicho modelo se muestra que varios sitios de fosforilación del RyR2 como por ejemplo el Ser²⁸⁰⁸ (PKA) y Ser²⁸¹⁴ (CaMKII) son partes de la misma “zona caliente de fosforilación”. Esta zona caliente de fosforilación, como se ve, puede ser blanco de varias quinasas y puede contener otros fosfo-epítopes aún no caracterizados (Valdivia, 2012).

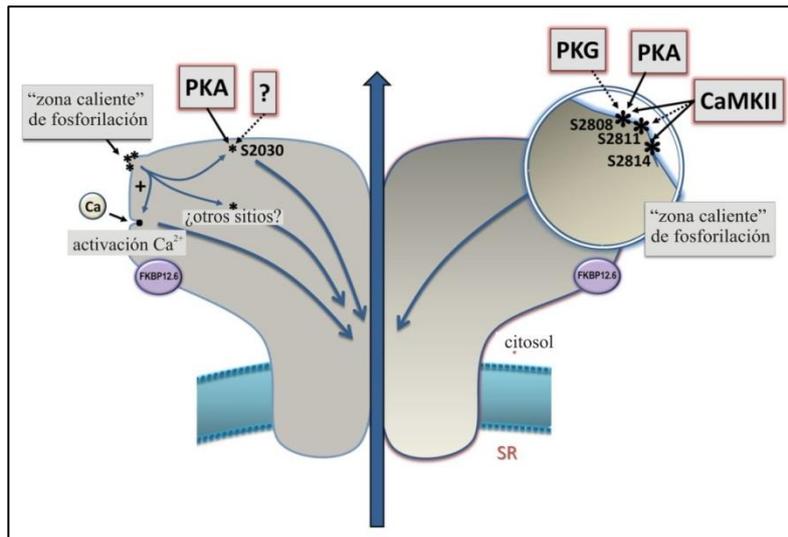


Figura 21. Modelo de RyR2 que muestra el concepto de “zona caliente” de fosforilación. Se muestran algunos sitios de fosforilación, como el Ser²⁸⁰⁸ y Ser²⁸¹⁴ formando parte de una misma “zona caliente” (Modificada de Valdivia, 2012).

4.2. REGULACIÓN DEL RYR2 POR OXIDOREDUCCIÓN Y NITROSILACIÓN

La función del RyR2 también está sujeta a una compleja regulación redox, que es de relevancia fisiológica y patológica. Así se ha descrito que el estrés oxidativo, específicamente los ROS, activa a los RyR2, probablemente por la formación de uniones disulfuro (Köhler y col., 2014).

Se demostró también que bajo condiciones oxidativas, la P_o de los RyR2 aumenta dando como resultado una pérdida aumentada de Ca^{2+} del RS, especialmente durante la diástole. Esto genera un contenido de RS disminuido y transitorios de Ca^{2+} sistólicos de menor amplitud (Zable y col., 1997). Coincidente con este hallazgo, los agentes reductores como ditioneítrito (DTT) o β -mercaptoetanol generan una disminución en la activación de los RyR2 (Kawakami y col., 1998). Por otra parte, el agregado de *scavengers*, es decir sustancias captoras de los ROS, atenúan la pérdida de Ca^{2+} a través de los RyR2 en la enfermedad cardíaca (Yano y col., 2005). También se ha encontrado evidencia de que la activación de los RyR2 inducida por ROS depende tanto de la duración como de la concentración de ROS. Se ha reportado que luego de una exposición larga o a altas concentraciones de ROS, ocurre inactivación de los RyR2 (Yan y col., 2008).

En un trabajo reciente de Becerra y colaboradores (Becerra y col., 2016), se demostró que en corazones sujetos a I/R ocurren cambios redox en los RyR2 en conjunto con la fosforilación de los mismos por CaMKII. Ambas modificaciones post-transcripcionales demostraron actuar de manera sinérgica en determinar la arritmogénesis ocurrida durante la reperfusión.

4.3. REGULACIÓN DEL RYR2 POR EL Ca^{2+} INTRARRETICULAR: ROL DE LA CALSECUESTRINA, JUNTINA, TRIADINA Y LA PROTEÍNA DE UNIÓN DE Ca^{2+} RICA EN HISTIDINA.

4.3.1. Regulación por CSQ

La calsecuestrina (CSQ) es la principal proteína de unión de Ca^{2+} dentro del RS. Posee un peso molecular aproximado de 45 kDa (Scott y col., 1988). Se encuentra asociada a la membrana del RS en los sitios de unión (JRS) en proximidad de los "pies" del RyR2 (Franzini-Armstrong y col., 1999). Es altamente ácida, con 119 residuos glutamato y aspartato (en total 64 cargas negativas) y con capacidad de unir 20 iones Ca^{2+} con baja afinidad (con un K_m aparente de $500 \mu\text{M Ca}^{2+}$) (Scott y col., 1988).

Al unirse con el Ca^{2+} se produce un cambio en la forma de la molécula (Ikemoto y col., 1972; Cozens y col., 1984; Wang y col., 1998; Park y col.; 2003). Los monómeros de CSQ tienen una estructura formada por tres tiorredoxinas plegadas. Las zonas de baja afinidad de unión al Ca^{2+} se encuentran en las regiones cargadas negativamente en el extremo terminal carboxilo y en las superficies anterior y posterior de la molécula (Wang y col., 1998; Park y col.; 2003). Estas superficies forman complejos frente a frente y dorso a dorso en los multímeros de CSQ (Figura 22).

Esta proteína también podría participar activamente en la regulación de RyR2. En base a estudios en bicapa de RyR2, Györke y colaboradores (Györke y col., 2004) sugirieron que la P_o de los RyR2 (en presencia de triadina y juntina) se inhibe por la CSQ a bajas concentraciones de Ca^{2+} del RS, pero esta inhibición se libera a altas concentraciones de Ca^{2+} del RS. De este modo es posible que la CSQ contribuya a la detección de la concentración Ca^{2+} luminal por parte del RyR2. Es decir que la CSQ estaría *sensando* el nivel de Ca^{2+} intraluminal.

Dos proteínas relacionadas a CSQ son la triadina y la juntina que acoplan físicamente la CSQ al RyR2. Las interacciones entre esas proteínas y la CSQ también son sensibles al Ca^{2+} (Zhang y col., 1997). De este modo, a medida que cae la concentración de Ca^{2+} dentro del RS durante la liberación de Ca^{2+} , la CSQ puede unirse más fuertemente a la triadina y/o juntina. Esta interacción podría facilitar la separación del Ca^{2+} de la CSQ y la liberación de Ca^{2+} del RS o podría participar indirectamente en el disparo de Ca^{2+} por el RyR2.

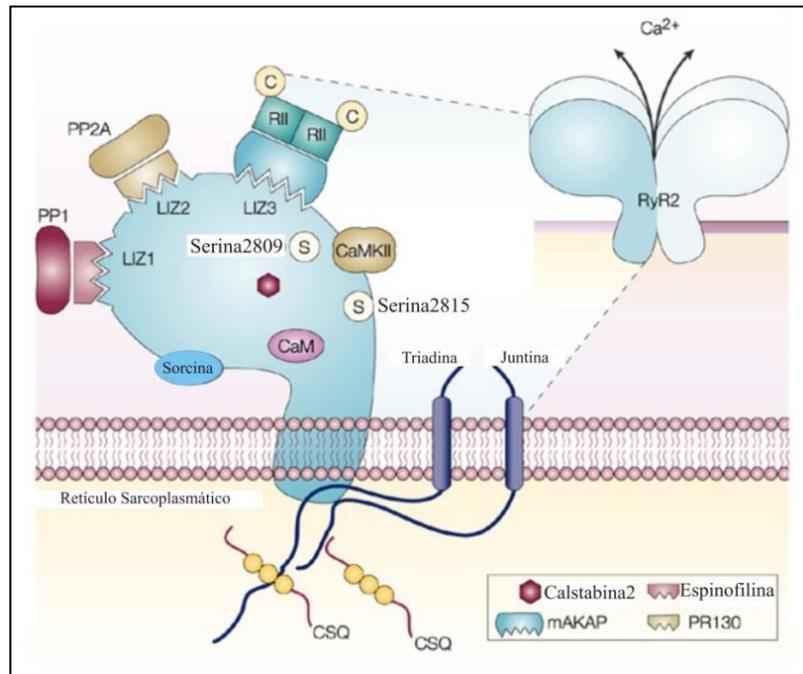


Figura 22. Receptor de rianodina tipo 2. El RyR2 es un complejo macromolecular que incluye 4 subunidades idénticas, a cada una de las cuales se une la calstabilina2 como así también las fosfatasas y quinasas. Los sitios cremallera de leucina-isoleucina (LIZ) median la unión de proteínas adaptadoras (Calstabilina2, Espinofilina, mAKAP, PR130) que unen a las proteínas fosfatasas PP1 y PP2A y a la proteína quinasa A (PKA), al complejo del canal. La PKA consiste en dos subunidades regulatorias (RII) y dos catalíticas (C). La calstabilina2, calmodulina (CaM), la CaMKII y sorcina también se unen a la superficie citoplásmica del RyR2 (Modificado de Wehrens y col., 2004).

En el lumen del RS también existe una proteína de unión de Ca^{2+} rica en histidina (HRC de 170kDa) que se une a la triadina (Hofmann y col., 1989; Lee y col., 2001; Sacchetto y col., 2001). Recientemente se ha reportado el hallazgo de una variante genética (Ser96Ala) en la proteína HRC que está ligada a arritmias ventriculares y muerte súbita en la cardiomiopatía dilatada. Experimentos realizados por el grupo de Kranias y colaboradores revelaron que el mecanismo arritmogénico de las personas que portan esta mutación, está dado por la liberación anormal de Ca^{2+} del RS y la mayor susceptibilidad a las DADs (Singh y col. 2013).

En tanto que la CSQ estabiliza los RyR2 y los vuelve refractarios a la liberación de Ca^{2+} del RS, la HRC aumenta la actividad de los mismos y facilita su recuperación funcional en el período diastólico. En ratones con ablación de ambas proteínas se demostró menor liberación de Ca^{2+} por el RS y menor fuerza contráctil a altas frecuencias, sugiriendo que la presencia simultánea de ambas proteínas es necesaria para el mantenimiento de un ciclo de Ca^{2+} robusto a altas frecuencias de contracción (Liu y col., 2015).

Existen otras proteínas dentro del RS que podrían interactuar con el RyR2 directa o indirectamente. Éstas incluyen la sarcolumenina (SAR) que tiene una mitad amino terminal altamente ácida (130 kDa

en corazón) y la ubicua chaperona del retículo endoplasmático (RE), calreticulina, que también une Ca^{2+} con baja afinidad (Leberer y col., 1989; Shoshan-Barmatz y col., 1996).

4.3.2.Regulación del RyR2 por el Ca^{2+} intraluminal

El Ca^{2+} intraluminal ha sido propuesto como uno de los mecanismos de la terminación del mecanismo de CICR del RS a través de la desactivación dependiente de Ca^{2+} luminal de los RyR2s. Terentyev y colaboradores, entre otros, estudiaron la importancia de los mecanismos regulatorios del Ca^{2+} citosólico versus el intraluminal en el control de la CICR. Estos autores evaluaron el impacto del uso de amortiguadores de Ca^{2+} dentro del RS en las propiedades de liberación de Ca^{2+} global y local, utilizando miocitos estudiados mediante la técnica de *patch clamp* o permeabilizados. A nivel celular encontraron que el aumento de los amortiguadores de Ca dentro del RS, exacerbaba la magnitud de los transitorios de Ca^{2+} inducido por I_{Ca} y alteraba la relación: liberación Ca^{2+} del RS– I_{Ca} . También hallaron aumentada la amplitud y el tiempo al pico de las chispas de Ca^{2+} así como también la duración de las mismas. . Todos estos resultados demuestran que la regulación de la apertura de los RyR2 por el Ca^{2+} intra RS es responsable de la terminación de la CICR y de la subsecuente restauración del comportamiento de los RyR2 en el musculo cardíaco (Terentyev y col., 2002).

4.3.3.Regulación del RyR2 por Ca^{2+} extracelular.

El mecanismo que regula la liberación de Ca^{2+} del RS es la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) como ya se expuso anteriormente (Fabiato y col., 1975). La apertura de un único canal de Ca^{2+} tipo L que enfrenta la zona de un couplón (y la unión de 2 a 4 iones de Ca^{2+} al RyR2), es suficiente para que se active completamente el proceso de liberación de Ca^{2+} en dicho couplón. En un couplón, los RyR2 vecinos se activan ya sea por alto Ca^{2+} local ($> 10 \mu\text{M}$), producto de la liberación de Ca^{2+} desde el RS a través de los RyR2 debido al Ca^{2+} que ingresa por los canales L o por disparo acoplado entre RyR2s. El tener más de un canal de Ca^{2+} por couplón (10-25 DHPR/100RyR2) genera un margen seguro para garantizar que cada couplón disparará. Es interesante resaltar que solamente una fracción de canales de Ca^{2+} tipo L y de RyR2s tienen que abrirse en una célula para producir flujos de Ca^{2+} que se puedan medir (Bers, 2004).

También se ha propuesto a la corriente de Ca^{2+} del canal tipo T ($I_{\text{Ca,T}}$) como responsable de la liberación de Ca^{2+} del RS. Esta corriente podría funcionar como la $I_{\text{Ca,L}}$, pero en la mayoría de los miocitos ventriculares es no funcional. Aún en las células en las que se encuentra presente (por ejemplo en células de Purkinje y células auriculares), la $I_{\text{Ca,T}}$ es mucho más débil que la $I_{\text{Ca,L}}$ como para disparar la liberación de Ca^{2+} (Sipido y col., 1998; Zhou y col., 1998). Los canales de Ca^{2+} tipo T

no están ubicados preferentemente en las regiones de unión y son sólo un contribuyente menor al AEC.

Cuando el NCX funciona en su modo invertido, el Ca^{2+} ingresado puede disparar la liberación de Ca^{2+} del RS y la contracción; esto puede ocurrir fundamentalmente a un E_m muy positivo y cuando $I_{\text{Ca,L}}$ ya está bloqueada (Levi y col., 1994; Litwin y col., 1998). Pero un influjo dado de Ca^{2+} a través de $I_{\text{Na/Ca}}$ es mucho menos efectivo y más lento que la $I_{\text{Ca,L}}$ en disparar la liberación de Ca^{2+} del RS. Por lo tanto, cuando ambas corrientes coexisten, la $I_{\text{Ca,L}}$ y la $I_{\text{Na/Ca}}$, la CICR está controlada casi completamente por la $I_{\text{Ca,L}}$ (Bers 2002).

El inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3) puede disparar la liberación de Ca^{2+} del RS del músculo liso y del RS en diferentes tipos celulares a través de los receptores de InsP3. Existen receptores de InsP3 en los miocitos (principalmente la isoforma 2) (Lipp y col., 2000; Perez y col., 1997). A pesar de que grandes concentraciones de InsP3 pueden dar lugar a una liberación de Ca^{2+} en miocitos cardíacos (particularmente en las células auriculares que tienen mayor cantidad de estos receptores), la celeridad y extensión de la liberación de Ca^{2+} son mucho menores que para la CICR y no se ha demostrado que los potenciales de acción estimulen la producción de InsP3. Aún más, agonistas α_1 -adrenérgicos cardíacos y muscarínicos incrementan la producción de InsP3 y la fuerza contráctil (Poggioli y col., 1986), pero éste efecto inotrópico parece estar mediado mayormente por la proteína quinasa C más que por InsP3 (Bers, 2002; Salas y col., 2001).

En resumen (Figura 23), la liberación de Ca^{2+} del RS por Ca^{2+} extracelular ocurre fundamentalmente a través de CICR disparado por la $I_{\text{Ca,L}}$ y la consiguiente entrada de Ca^{2+} . Los otros mecanismos descritos pueden liberar Ca^{2+} pero sin la importancia predominante de la CICR (Bers, 2002).

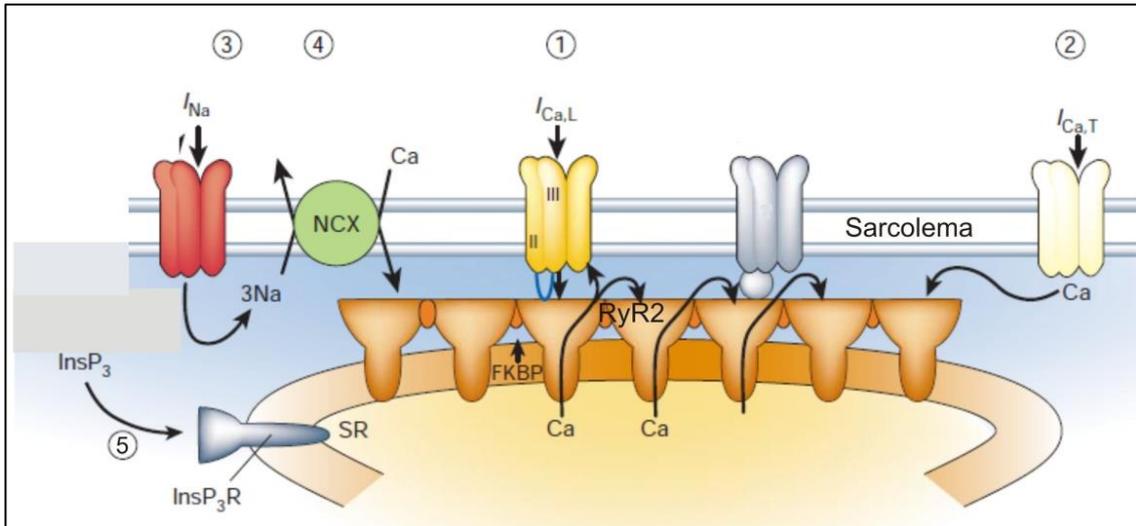


Figura 23. Principales mecanismos candidatos para la liberación de Ca^{2+} por RS. 1: Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR), mediada por la corriente de Ca^{2+} del canal tipo L ($I_{Ca,L}$); 2: CICR mediada por corriente de Ca^{2+} del canal tipo T ($I_{Ca,T}$); 3 y 4: CICR disparada por el influjo de Ca^{2+} a través del intercambiador NCX ; 5: Liberación de Ca^{2+} disparada por el inositol 1,4,5-trifosfato ($InsP_3$) a través de los receptores de $InsP_3$. $FKBP$: proteína de unión FK-506, NCX : intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (Figura modificada de Bers, 2002).

III. ARRITMIAS

Como se describió en el Capítulo I, normalmente el corazón se encuentra bien regulado en términos de su red de propagación eléctrica, de modo tal que los PA se generan y propagan de forma sincronizada, siguiendo un patrón característico y repetitivo.

Se denomina *arritmia* a la alteración, en la frecuencia o en el ritmo de este patrón de activación normal (Bers, 2001). Se sabe que las arritmias son una de las principales causas de muerte súbita (Cleland y col., 2002; Mozaffarian y col., 2007). La comprensión del mecanismo subyacente de esta patología es fundamental para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos útiles para prevenir el riesgo de muerte súbita en los pacientes con arritmias.

Las arritmias se pueden desarrollar: (1) como resultado de cambios en la frecuencia de los impulsos del marcapaso en el nodo sinoauricular, (2) por modificaciones eléctricas o estructurales que alteran la propagación del impulso, (3) a través de mecanismos a nivel celular disparados focalmente como liberaciones anómalas de Ca^{2+} del RS que se propagan en formas de ondas regenerativas de Ca^{2+} a lo largo del miocito (Laurita y col., 2008).

Gran parte de las arritmias observadas en la insuficiencia cardíaca, por ejemplo, o en la intoxicación digitalica, son disparadas por éste último mecanismo (Pogwizd y col., 2004; Laurita y col., 2008; Gonano y col., 2011; Luo y col., 2013; Mazzocchi, y col., 2016) y son las que estudiaremos en el presente trabajo.

1. MECANISMO DE GENERACIÓN DE ARRITMIAS POR Ca^{2+}

El mecanismo de generación de arritmias por Ca^{2+} es el siguiente: en condiciones normales existe una pequeña pérdida de Ca^{2+} a través de los RyR2, debida a la apertura espontánea y esporádica en diástole de estos canales de Ca^{2+} . Esa pérdida de Ca^{2+} se observa con microscopía confocal como una chispa de Ca^{2+} o *spark de Ca^{2+}* , como fue denominada por sus descubridores (Cheng y col., 1993). En realidad, esta chispa o destello de Ca^{2+} es consecuencia de la pérdida de Ca^{2+} no por un solo RyR2 sino por un grupo o *clúster* de estos receptores. Un aumento en esta pérdida de Ca^{2+} diastólica, puede ocasionar ondas de Ca^{2+} (*Ca^{2+} waves*), que son eventos que se propagan intracelularmente, y son normalmente arritmogénicos en el corazón entero cuando las ondas de Ca^{2+} ocurren simultáneamente en un número considerable de células vecinas (Nahhas y col., 2013)

El aumento de la pérdida de Ca^{2+} puede ocurrir principalmente por dos razones: un aumento del contenido de Ca^{2+} en el RS, ya que a mayor contenido mayor pérdida espontánea de Ca^{2+} a través de

los RyR2 (Cheng y col., 1993), y/o por alteraciones a nivel del RyR2, ya sea por mutaciones, fosforilaciones o cambios en el estado redox de los mismos, alteraciones que sensibilizan los RyR2 al Ca^{2+} citosólico y disminuyen el umbral de Ca^{2+} del RS necesario para que ocurra la pérdida diastólica.

En la Figura 24 se muestra un esquema que representa lo expresado anteriormente.

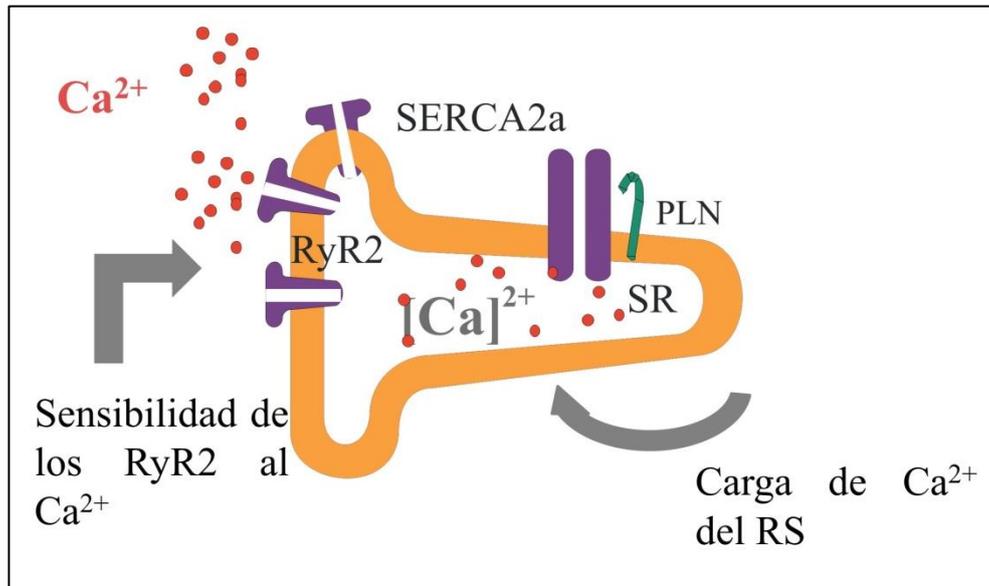


Figura 24. Factores determinantes de la pérdida de Ca^{2+} del RS. La pérdida de Ca^{2+} está determinada principalmente por un aumento en la carga o contenido de Ca^{2+} del RS y por alteraciones que sensibilizan al RyR2.

Las ondas de Ca^{2+} se propagan por el citosol y aumentan la salida de Ca^{2+} por el NCX. Esto a su vez da lugar a un aumento en la entrada de Na^+ que despolariza la membrana plasmática dando lugar a las DAD. Si estas despolarizaciones alcanzan el umbral de excitabilidad, darán lugar a un latido ectópico.

Por otra parte el Ca^{2+} que se pierde del RS puede aumentar el Ca^{2+} local y facilitar el ingreso a las mitocondrias y aumentar así el Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, responsable en gran medida de la apoptosis y necrosis observada en la I/R (Di Carlo y col., 2014).

En la Figura 25 se esquematiza el mecanismo de generación de arritmias por Ca^{2+} .

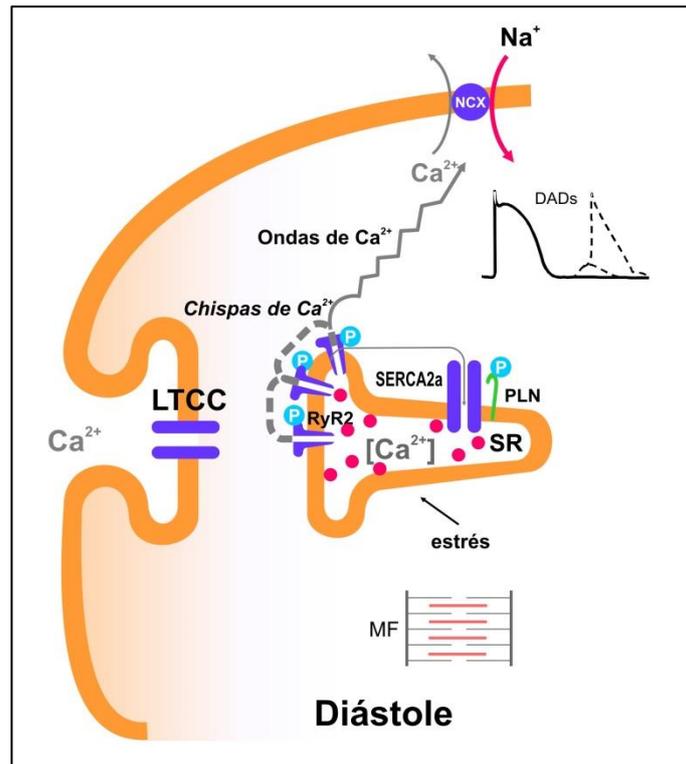


Figura 25. Mecanismos de generación de potenciales de acción espontáneos disparados por Ca^{2+} . Las ondas de Ca^{2+} propagables a través del citosol producto de la apertura de clústeres de RyR2 contiguos genera una salida de Ca^{2+} y entrada de Na^+ por el NCX. Esto da lugar a despolarizaciones tardías de la membrana plasmática que, en caso de alcanzarse el umbral de excitabilidad, puede dar lugar a un latido ectópico.

1.1. ARRITMIAS GENERADAS A NIVEL CELULAR. ROL DEL RyR2 Y DE LA CaMKII.

Diferentes grupos de investigación han realizado experimentos para dilucidar el rol del estado de los RyR2 en las arritmias disparadas por Ca^{2+} . A continuación se detallan algunos de ellos.

En un trabajo de Lukyanenko utilizando miocitos aislados de rata y microscopía confocal se demostró que la potenciación de la liberación de Ca^{2+} del RS a través del aumento del Ca^{2+} luminal es un factor importante en la generación de la onda de Ca^{2+} (Lukyanenko y col., 1999).

También se demostró que la fosforilación del RyR2 por CaMKII en su sitio Ser²⁸¹⁴, aumenta la pérdida de Ca^{2+} en diástole y genera arritmias, por ejemplo en la insuficiencia cardíaca causada por sobreexpresión de CaMKII (Ai y col., 2005).

Hace ya varios años se encontró que existe una mutación puntual en los RyR2 que hace que éste sea más propenso a liberaciones espontáneas de Ca^{2+} del RS ante una estimulación adrenérgica. Esta mutación hace que los pacientes que la poseen exhiban un síndrome arritmogénico heredado que

causa muerte súbita, denominado taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT son sus siglas en inglés) (Liu y col., 2008).

En animales en los que el sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 fue reemplazado por el aminoácido aspártico (D), de tal manera que el RyR2 se comporta como permanentemente fosforilado en el sitio de CaMKII (cepa S2814D), se comprobó que esta pseudofosforilación predisponía a dichos animales a las arritmias por estrés (van Oort y col., 2010).

El tratamiento con ouabaina (un digitálico que por inhibición de la bomba de Na⁺/K⁺ induce la acumulación intracelular de Na⁺ generando un aumento en el Ca²⁺ intracelular a través del NCX) en miocitos aislados de rata provoca la aparición de contracciones espontáneas mediadas por fosforilaciones dependientes de CaMKII, y el mecanismo subyacente a estas arritmias por digitálicos es la fosforilación del blanco de CaMKII, el RyR2 (Gonano y col., 2011).

En un trabajo de Said y colaboradores utilizaron ratones WT y ratones con imposibilidad de fosforilar el sitio dependiente de CaMKII en el RyR2 por mutación genética (mutación del sitio Ser²⁸¹⁴, serina por alanina, denominados S2814A). Al someter a los ratones S2814A a un protocolo de I/R, estos desarrollaron un 60% menos de latidos prematuros durante la reperfusión en comparación a los ratones WT demostrando que la fosforilación dependiente de CaMKII del RyR2 es responsable de las arritmias durante la reperfusión (Said y col., 2011).

1.2. ARRITMIAS GENERADAS A NIVEL CELULAR. ROL DEL LA RECAPTURA DE Ca²⁺ DEL RS

Si bien todos los trabajos mencionados en el apartado anterior enfatizan el rol fundamental de la alteración del receptor de RyR2 en la producción de PA espontáneos, el rol jugado por la alteración de la recaptura de Ca²⁺ por la SERCA2a es muy discutido. A continuación detallaremos trabajos realizados con el objetivo de estudiar el rol que juega la recaptura de Ca²⁺ del RS en las arritmias disparadas por Ca²⁺. Muchos de estos trabajos muestran resultados contradictorios entre sí.

En experimentos realizados en miocitos ventriculares de conejos, se utilizó la transfección adenoviral para sobreexpresar la proteína SERCA2a y estudiar su impacto en la incidencia de despolarizaciones tardías y arritmias. El resultado fue que el aumento de la expresión de SERCA2a mejoró la función sistólica y diastólica y redujo la muerte celular y las despolarizaciones tardías arrítmicas (Davia y col., 2001).

Landgraf y colaboradores mostraron que la inhibición de la SERCA y del canal de calcio mitocondrial (MUC) mediante la aplicación de tapsigargina y ruthenium 360, respectivamente, en miocitos aislados de rata, disminuyó la velocidad de las ondas de Ca^{2+} . Este grupo sugirió que este efecto se debe probablemente a una reducción en la P_o de los RyR2 sugiriendo además que la señalización de Ca^{2+} intracelular depende tanto del Ca^{2+} luminal del RS como de la concentración citosólica del mismo (Landgraf y col., 2004).

Del Monte y colaboradores utilizaron un modelo de isquemia y reperfusión en ratas con transfección adenoviral de SERCA2a y utilizaron electrocardiografía por telemetría para estudiar el modelo. Sus resultados mostraron que el mejoramiento del manejo del Ca^{2+} intracelular por aumento de la expresión de SERCA2a restableció la función contráctil y redujo las arritmias ventriculares por I/R (del Monte y col., 2004).

En un modelo de corazón porcino sometido a isquemia, se estudió el impacto de la sobreexpresión de SERCA2a sobre las arritmias ventriculares isquémicas. Los resultados mostraron que esta estrategia redujo significativamente este tipo de arritmias, enfatizando su importancia desde el punto de vista clínico (Prunier y col., 2008). En contraste, en ratones con ablación de la SERCA2a se observó una reducción de la amplitud y velocidad de decaimiento del transitorio de Ca^{2+} , menor contenido de Ca^{2+} del RS y menos propensión al desarrollo de ondas de Ca^{2+} (Stokke y col., 2010).

Bai y colaboradores describieron que un aumento en la recaptura de Ca^{2+} a través de la ablación de PLN en ratones con una mutación en los RyR2 inductora de CPVT fue eficaz para suprimir las arritmias disparadas por Ca^{2+} (Bai y col., 2013).

Recientemente se encontró una mutación a nivel de la PLN (R25C, sustitución del aminoácido arginina 25 por una cisteína) en una familia con cardiomiopatía congénita (DCM). Para estudiar el efecto de esta mutación en cuanto a su significado funcional en el manejo de Ca^{2+} y contractilidad, se sobreexpresó la R25C-PLN en cardiomiocitos aislados de rata. Esto arrojó como resultado una disminución en la afinidad al Ca^{2+} de la SERCA, con una disminución de la recaptura de Ca^{2+} por el RS, de los transitorios de Ca^{2+} y una función contráctil empeorada, en comparación con los miocitos con PLN WT, como consecuencia del menor contenido de Ca^{2+} del RS (Liu y col., 2015).

Estos ratones también mostraron un aumento en la frecuencia de las chispas y ondas de Ca^{2+} y de las DAD inducidas por estrés. Al mismo tiempo se encontró un aumento en la actividad de la CaMKII de la mano con una fosforilación aumentada del sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2. Esta fosforilación se asoció a un aumento de la propensión a arritmias por estrés. En conjunto esos hallazgos ponen de manifiesto que la mutación humana R25C en la PLN se asocia con una súper inhibición de la SERCA2a y el

transporte de Ca^{2+} así como también una pérdida de Ca^{2+} del RS aumentada dando lugar esto a arritmogénesis bajo condiciones de estrés. Además esta mutación podría ser un factor predecesor a un aumento en el riesgo de arritmias ventriculares en pacientes con DCM. En resumen este trabajo mostró por primera vez una evidencia mecanística de que el incremento de la inhibición d PLN puede afectar tanto la recaptura de Ca^{2+} del RS como la liberación de Ca^{2+} del RS y sugirió que la mutación R25C de la PLN puede ser un factor pronóstico para un mayor riesgo de arritmias ventriculares en las personas que posean DCM (Liu y col., 2015).

A continuación, a modo de resumen, se muestra la Tabla 1 en la cual se clasifica a los autores recientemente citados de acuerdo con las consecuencias que implica el aumento en la recaptura de Ca^{2+} del RS sobre las arritmias.

Beneficioso	Perjudicial
Davia y col. J Mol Cell Cardiol. 2001.	Du Toit y col. J Am Coll Cardiol. 1994.
Del Monte y col. PNAS. 2004.	Lukyanenko y col. J Physiol. 1999.
Prunier y col. Circ. 2008.	Landgraf y col. Mol Cell Biochem. 2004.
Bai y col. Circ Res. 2013.	Stokke y col. Cardiovasc Res. 2010.
	Liu y col. Cardiovasc Res. 2015

Tabla 1. Autores que estudiaron el aumento de recaptura de Ca^{2+} del RS y su consecuencia sobre las arritmias disparadas por Ca^{2+} .

Estos resultados contradictorios deben obedecer seguramente a diferentes causas, pero podrían deberse, al menos en parte, a los efectos opuestos propios al aumento de la recaptura de Ca^{2+} del RS sobre el Ca^{2+} citosólico: un aumento en la recaptura de Ca^{2+} del RS disminuye el Ca^{2+} citosólico y el riesgo de arritmias, pero a su vez, da lugar a un aumento en la carga de Ca^{2+} del RS y por ende a una mayor sensibilización de los RyR2 por el Ca^{2+} aumentando la pérdida diastólica de Ca^{2+} del RS y el riesgo de ondas de Ca^{2+} arritmogénicas. La Figura 26 esquematiza esta relación.

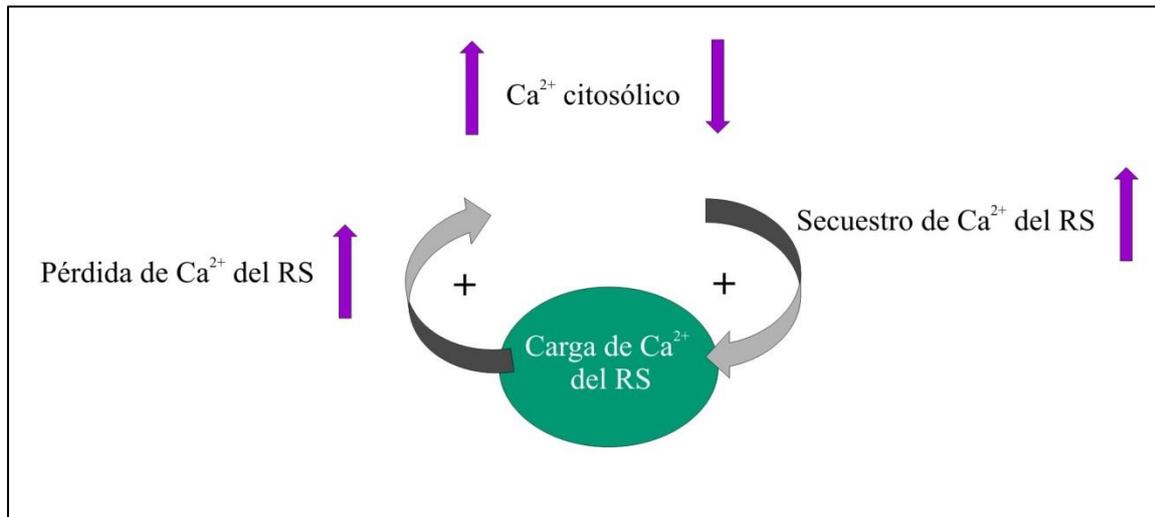


Figura 26. El incremento en la recaptura de Ca^{2+} del RS disminuye el Ca^{2+} citosólico e incrementa la pérdida de Ca^{2+} del RS.

Los efectos opuestos que tiene el incremento en la recaptura de Ca^{2+} del RS sobre el Ca^{2+} citosólico pueden estar exacerbado si además coexisten con un incremento en la probabilidad de apertura de los RyR2 como la que ocurre debido a la fosforilación del sitio Ser²⁸¹⁴ dependiente de CaMKII (Ai y col., 2005) favoreciendo este ciclo fútil de aumento en la recaptura y pérdida de Ca^{2+} del RS agregando un costo metabólico debido al consumo de ATP de la SERCA2a. De este modo, los efectos beneficiosos del aumento de la recaptura de Ca^{2+} del RS pueden resultar perjudiciales en condiciones en las que se pierde el equilibrio entre la captación y pérdida de Ca^{2+} del RS.

El panorama aquí descrito fue un disparador para llevar a cabo el presente trabajo de *Tesis Doctoral* con el fin de intentar aportar una respuesta al rol que juega el aumento de la recaptura de Ca^{2+} por el RS en las arritmias disparadas por Ca^{2+} en presencia de una RyR2 constitutivamente fosforilado en el sitio Ser²⁸¹⁴ y por lo tanto con predisposición a generar arritmias.

HIPÓTESIS

De acuerdo a los antecedentes planteados, nuestra hipótesis es que el aumento en la recaptura de Ca^{2+} por el RS es capaz de prevenir las arritmias de reperfusión y aquellas que ocurren en situación de estrés (por ejemplo, liberación de catecolaminas) y que dependen de la fosforilación del RyR2 mediada por CaMKII, en el sitio Ser²⁸¹⁴.

OBJETIVOS

General

Establecer el rol que desempeña el aumento en la recaptura de Ca^{2+} del RS a través de la ablación de la PLN en las arritmias producidas por estrés y por reperfusión

Particulares

1. Caracterizar desde el punto de vista mecánico, estructural y del manejo de Ca^{2+} intracelular a la cepa de ratón doble mutante generada en nuestro laboratorio y que fue utilizada en los experimentos para explorar la hipótesis del presente trabajo de Tesis.
2. Evaluar la hipótesis que el aumento de la recaptura de Ca^{2+} por el RS asociado a modificaciones de los RyR2 asociadas con un aumento de la pérdida de Ca^{2+} por el RS, es suficiente para prevenir las arritmias que ocurren en estos animales en condiciones de estrés (alta frecuencia cardíaca y alta concentración de Ca^{2+} extracelular).
3. Evaluar la hipótesis que el aumento de la recaptura de Ca^{2+} por el RS es capaz de atenuar las arritmias por I/R, producidas al menos principalmente por fosforilación mediada del RyR2 mediada por CaMKII.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar las hipótesis propuestas en el presente trabajo de Tesis se utilizaron ratones mutantes y se combinaron técnicas de histología, ecocardiografía, electrocardiografía (*in vivo*), registro de potenciales de acción (PA), de presión ventricular y de Ca^{2+} intracelular en corazones intactos (*ex vivo*). También se utilizaron herramientas farmacológicas.

Todos los experimentos realizados con ratones se realizaron siguiendo las normativas institucionales y los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP (CICUAL # P03-01-15).

1. ANIMALES

Todos los experimentos fueron realizados con ratones de 3 a 4 meses de edad. Se utilizaron ratones silvestres (WT) y tres cepas de ratones mutantes que se detallan a continuación.

- a. **PLNKO**. Estos ratones poseen ablación de la PLN y por lo tanto una recaptura de Ca^{2+} del RS aumentada. Esta cepa de ratones transgénicos fue cedida por la Dra. Kranias del laboratorio del Departamento de Farmacología y Biofísica Celular de la Universidad de Cincinnati, EE.UU. (Luo y col., 1994) y se crían, al igual que el resto de las cepas utilizadas en el proyecto, en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.
- b. **S2814D**. Esta cepa de ratones posee una pseudofosforilación constitutiva en el sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 (residuo blanco de la CaMKII) que produce un aumento de la sensibilidad del RyR2 al Ca^{2+} citosólico. Este cambio en la sensibilidad al Ca^{2+} de los RyR2 determina una mayor liberación de Ca^{2+} para un dado Ca^{2+} del RS en sístole y un aumento en la pérdida de Ca^{2+} del RS en diástole a través de los RyR2 (Van Oort y col., 2010). Esta cepa de ratones fue cedida por el Dr. Xander Wehrens, Baylor College of Medicine Houston, TX, EE.UU.
- c. **SDKO**. Cepa resultante de la cruce de los ratones PLNKO con los ratones S2814D, que tienen como característica un aumento en la recaptura de Ca^{2+} del RS (por la no expresión de PLN) y un aumento en la liberación y pérdida de Ca^{2+} del RS por los RyR2.

El genotipo de los ratones se confirmó mediante análisis por PCR del ADN extraído de tejido de la cola de los mismos con cebadores específicos para la detección de cada mutación.

2. HISTOLOGÍA

Con la colaboración de la Cátedra de Patología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Plata, se evaluó la histología de los corazones de los ratones SDKO y WT. Después de la inclusión en parafina y la sección, las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina para determinar las dimensiones de la pared cardíaca y la morfología celular, y mediante la técnica de Picrosirius se evaluó la fibrosis intersticial (Laguens y col., 2002).

3. EXAMEN ECOCARDIOGRÁFICO.

Para estudiar la geometría basal y la función cardíaca de las cepas mutantes se utilizó la técnica de ecocardiografía bidimensional, operada en modo M con un transductor lineal de alta frecuencia (13MHz). El procedimiento se llevó a cabo en animales conscientes de entre 3 y 6 meses de edad. El estudio ecocardiográfico se realizó sin anestesia, luego de un periodo de habituación de los ratones a la manipulación de al menos tres días consecutivos. Las dimensiones sistólicas y diastólicas se establecieron de acuerdo con la Guía de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Lang y col., 2015). La función sistólica global derecha e izquierda se determinó calculando el acortamiento fraccional ventricular izquierdo (sus siglas en inglés, LVFS):

$$LVFS = (LVEDD - LVESD / LVEDD) \times 100$$

Donde el LVFS se expresa como porcentaje, y LVEDD y LVESD (de las siglas en inglés) son los diámetros ventriculares al final de la diástole y de la sístole respectivamente.

4. ELECTROCARDIOGRAMA

Los estudios de electrocardiografía superficial (ECG) *in vivo* se realizaron en ratones en estado consciente durante 30 minutos. Se utilizaron electrodos de ECG estándares (derivación I) y el sistema comercial de adquisición de datos PowerLab 4ST de AD Instruments®. Para estas mediciones se utilizó un sistema que se puede dividir en dos partes. Una diseñada en el laboratorio y otra comercial (Figura 27). El montaje diseñado en el laboratorio consistió en una cámara con una geometría de semi tubo de acrílico que permitía la introducción del animal cómodamente pero a la vez reduciendo los artefactos de movimiento. En la base del receptáculo se encontraban los contactos eléctricos que se conectaban al PowerLab. A continuación se muestra una fotografía del montaje. También se estudiaron ratones en condiciones basales por ECG de telemetría (6 SDKO y 6 WT) (Contreras y col., 2014), con la colaboración del Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Para poner de manifiesto la presencia de arritmias bajo condiciones de estrés el ECG superficial se registró por 10 minutos y luego se aplicó un estímulo catecolaminérgico por inyección intraperitoneal (IP) de cafeína y epinefrina, 120 mg.kg^{-1} y $1,6 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente.

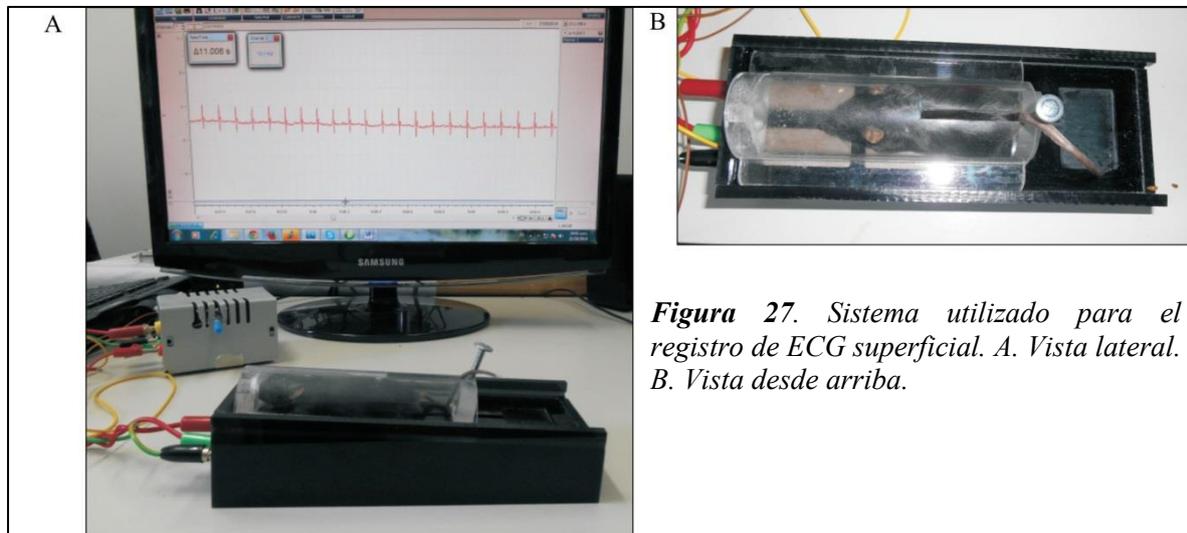


Figura 27. Sistema utilizado para el registro de ECG superficial. A. Vista lateral. B. Vista desde arriba.

5. PERFUSIÓN DE CORAZONES AISLADOS DE RATÓN.

Para realizar los experimentos *ex vivo* los animales se anestesiaron con una inyección IP de ketamina (anestésico general) y diazepam (sedante) (100 mg.kg^{-1} y 5 mg.kg^{-1} , respectivamente). Al alcanzarse la fase III de la anestesia, y una vez confirmada la pérdida de reflejo de retirada se realizó una toracotomía central, se extirpó el corazón y se canuló la aorta. El corazón aislado se mantuvo perfundido mediante la técnica de Langendorff con un flujo constante de entre 2 y 3 ml/min de solución Tyrode normal. La misma estuvo compuesta por (en mM): NaCl 140, KCl 5,4, CaCl_2 2, MgCl_2 1, Na_2HPO_4 0,33, HEPES 10, glucosa 10, pH=7,4. Esta solución se mantuvo equilibrada a lo largo de todo el tiempo de experimentación por burbujeo con O_2 al 100%. Una vez verificado el éxito de la canulación, se anuló el nodo auriculoventricular (AV) por medio del pinzamiento del mismo. Luego, utilizando un estimulador eléctrico externo se fijó la frecuencia de estimulación del corazón en 300 latidos/minuto (5 Hz). Los registros se realizaron a una temperatura de 37°C .

Para evaluar la actividad mecánica de los corazones, se retiró por disección la aurícula izquierda y se colocó un balón de polietileno dentro del ventrículo izquierdo (VI), a través del orificio auriculoventricular. El balón se conectó a un transductor de presión (MPX5050 Motorola, EE.UU.) a través de una delgada cánula. El balón y la cánula se llenaron con agua bidestilada desgaseada (para evitar la formación de burbujas que atenuarían la señal) de modo de fijar la presión de fin de diástole del VI (PFD). La contractilidad del VI se evaluó por medio de la presión desarrollada del VI (PDVI) y la

máxima velocidad de desarrollo de presión ($+dP/dt_{máx}$), y la relajación del ventrículo se estudió a través de la medida del tiempo hasta la mitad de la relajación (t_{50}).

6. TÉCNICA DE MICROELECTRODOS INTRACELULARES PARA MEDICIÓN DE POTENCIALES DE ACCIÓN.

Para realizar el registro de los PA *ex vivo* se utilizaron dos técnicas: microelectrodos intracelulares e indicadores fluorescentes. A continuación se detalla la primera.

Una vez confirmada la canulación exitosa del corazón, y alcanzada la temperatura de trabajo, se procedió al registro de los PA. La señal de PA transmembrana en corazón intacto se registró utilizando un microelectrodo de vidrio (microcapilar de 1,2 mm de diámetro) cargado con una solución conductora de KCl saturado (3 M) (10-20 M Ω de resistividad). Las señales se obtuvieron colocando el microelectrodo en la cara anterior del ventrículo izquierdo (VI), registrando en la capa epicárdica del corazón. Este microelectrodo se conectó a un cabezal preamplificador parte de un amplificador comercial de alta impedancia de entrada (Molecular Devices- Axoclamp 2A). Las señales digitales se filtraron a un ancho de banda de 500KHz y se muestrearon digitalmente a una frecuencia de 100KHz. Se utilizó el software de adquisición (LabChart 7.0) del sistema PowerLab 4ST de AD Instruments[®]. Para el registro se introdujo el microelectrodo superficialmente sobre el epicardio y una vez verificado el potencial de membrana polarizado se procedió al registro de la señal y al protocolo establecido. En la Figura 28 se esquematiza el montaje descrito.

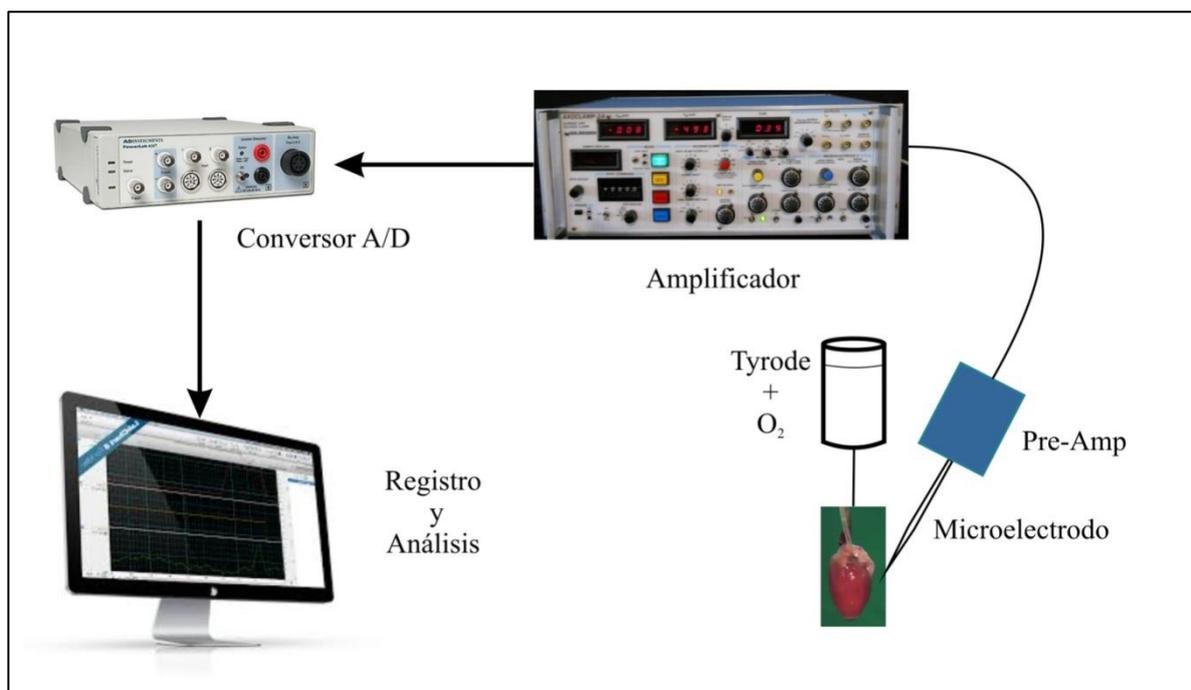


Figura 28. Montaje para la técnica de microelectrodos intracelulares

Esta técnica se utilizó para evaluar la aparición de arritmias durante la reperfusión luego de un periodo de isquemia. A continuación (Figura 29) se esquematiza el protocolo implementado para tal fin.

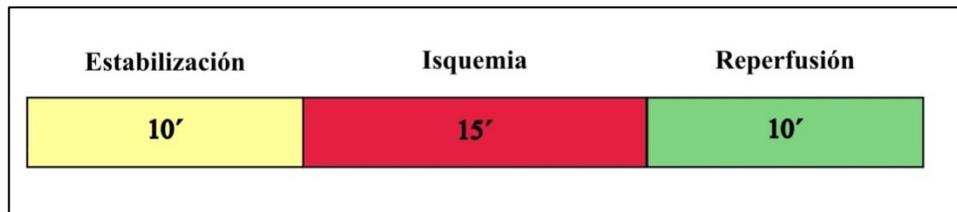


Figura 29. Protocolo de I/R.

7. TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA MEDICIÓN DE PA Y Ca^{2+} INTRACELULAR.

Como se mencionó anteriormente, el registro de PA se realizó también mediante el uso de indicadores fluorescentes. La técnica utilizada se basa en un sistema no comercial descrito por Escobar y colaboradores (Mejía-Alvarez y col., 2003) e instalado con su colaboración en nuestro laboratorio, que permite medir fluorescencia en el corazón intacto. El sistema se denomina Microscopía de Fluorescencia de Campo Local Pulsado (su sigla en inglés PLFFM). Esta misma técnica se utilizó para el estudio del manejo del Ca^{2+} intracelular. Luego de canular y perfundir los corazones, se procedió a la carga del corazón con los indicadores fluorescentes (ver a continuación). Una vez finalizada la carga del indicador y de que se lavara el excedente de indicador y se estabilizara la preparación a una frecuencia de estimulación de 5Hz durante 10 minutos, se procedió a registrar la señal de fluorescencia correspondiente al Ca^{2+} o el PA intracelular siguiendo diferentes protocolos.

Para un mejor ordenamiento se describirán en primer lugar los indicadores utilizados, luego el sistema PLFFM y por último los diferentes protocolos utilizados con el mismo.

7.1. INDICADORES FLUORESCENTES

Para evaluar el potencial transmembrana del corazón intacto se utilizó Di-8-ANEPPS (Sigma Aldrich®) y para el estudio de los cambios transitorios de Ca^{2+} intracelular en el citosol y en el RS del corazón intacto de ratón, se utilizaron dos indicadores fluorescentes (Thermo Fisher Scientific®), Rhod-2 AM y Mag-Fluo-4 AM, respectivamente. Para los experimentos realizados con Microscopía Confocal se utilizó el indicador Fluo -4AM.

7.1.1. Di-8-ANEPPS

Fórmula molecular: $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

Peso molecular: 592,8784

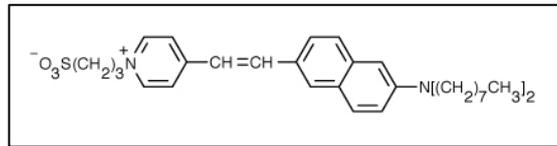


Figura 30. Fórmula del Di-8-ANEPPS.

Este indicador forma parte de la familia de los indicadores potenciométricos. En la Figura 30 se esquematiza su fórmula estructural. La membrana plasmática de una célula cardíaca tiene típicamente un potencial transmembrana de -80mV (negativa dentro) debido a un gradiente de concentración de K^+ , Na^+ y Cl^- que se mantiene por procesos de transporte activo. La formación de este gradiente electroquímico es posible gracias a que la membrana plasmática es semipermeable. Un indicador potenciométrico permite detectar de forma indirecta la translocación de esos iones.

El Di-8-ANEPPS se une a lípidos y su fluorescencia cambia en respuesta al cambio en el potencial eléctrico en su medio. Es por esto que es posible utilizarlo para medir de manera no invasiva las variaciones en el potencial de membrana. Su respuesta óptica es lo suficientemente rápida como para detectar cambios transitorios en el potencial (milisegundos) en células excitables como las cardíacas. El cambio de fluorescencia está entre un 2-10% por 100 mV. En la Figura 31 se muestra el espectro de excitación y emisión de este indicador.

Longitud de onda de excitación (λ_{Ex}) ~465nm

Longitud de onda de emisión (λ_{Em}) ~635nm

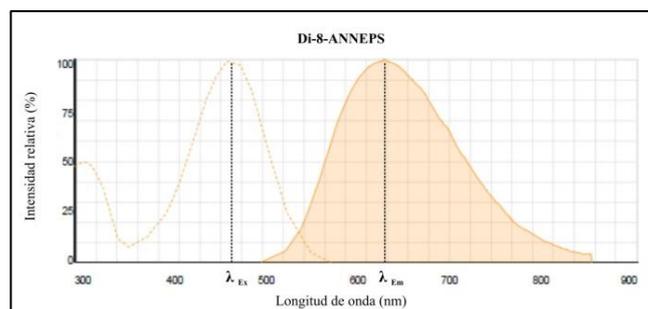


Figura 31. Espectro de excitación y emisión del Di-8-ANEPPS.

7.1.2. Rhod-2 AM

Fórmula molecular: $C_{52}H_{92}BrN_4O_{19}$

Peso molecular: 1123,96

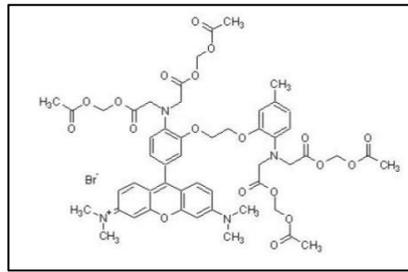


Figura 32. Fórmula del Rhod-2 AM.

El Rhod-2 AM es un indicador de Ca^{2+} que tiene la capacidad de permear dentro de la célula en su forma AM. En la Figura 32 se esquematiza su fórmula estructural. Al unirse a este ion incrementa considerablemente su fluorescencia (típicamente es mayor a 100 veces). El término AM hace alusión a que este tipo de indicadores están modificados en los ácidos carboxílicos por grupos ésteres AM (acetoximetilo) dando lugar a una molécula sin carga que puede permear las membranas celulares. Una vez dentro de la célula, los grupos bloqueantes lipofílicos son escindidos por esterasas no específicas dando lugar a una forma cargada que sale de la célula mucho más lentamente que el compuesto sin escindir (en algunos casos la hidrólisis de los grupos esterificados es esencial para que se una el ion de interés). En este trabajo se utilizó el Rhod-2 AM para la medición de Ca^{2+} en el citosol.

Longitud de onda de excitación (λ_{Ex}) ~552nm

Longitud de onda de emisión (λ_{Em}) ~581nm

Este indicador fue elegido por las siguientes características:

1. Gran incremento de la fluorescencia por unión al Ca^{2+} .
2. Cinética rápida (constante de disociación K_d : 570 nM determinada a 22°C en KCl 100 mM, MOPS 10mM, pH 7,2).
3. Su espectro de absorbancia se corresponde con la longitud de onda del láser utilizado en el sistema. (Ver Figura 33).

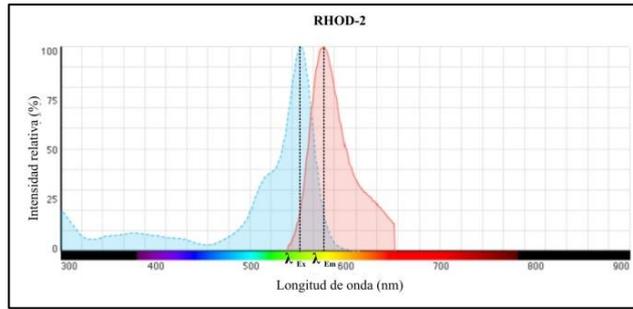


Figura 33. Espectro de excitación y emisión del Rhod-2 AM.

7.1.3. Mag-Fluo-4AM

Fórmula molecular: $C_{37}H_{33}F_2NO_{18}$

Peso molecular: 817,66

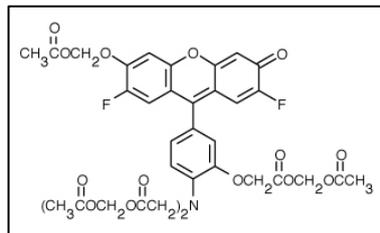


Figura 34. Fórmula del Mag-Fluo-4 AM.

Este indicador se une al Ca^{2+} intra RS aumentando su fluorescencia. En la Figura 34 se esquematiza su fórmula estructural. Debido a que este tipo de indicador posee una K_d alta (22 μM) es más apropiado para rastrear cinéticas de flujos rápidos de Ca^{2+} que aquellos indicadores con K_d menor a 1 μM . En la Figura 35 se exhibe el espectro del indicador.

Longitud de onda de excitación (λ_{Ex}) $\sim 490nm$

Longitud de onda de emisión (λ_{Em}) $\sim 510nm$

K_d : 22 μM (determinada a 22°C en KCl 100 mM, MOPS 10 mM, pH 7,2.)

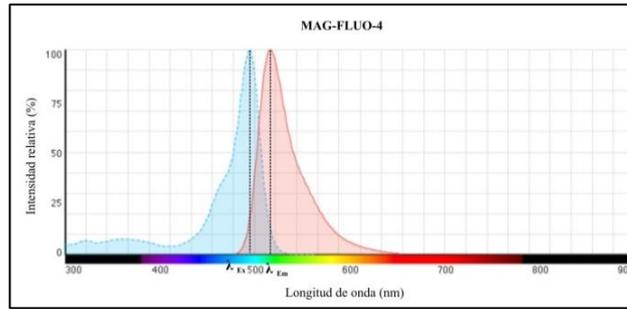


Figura 35. Espectro de excitación y emisión del Mag-Fluo-4 AM.

7.1.4. Fluo-4AM

Fórmula molecular: $C_{51}H_{50}F_2N_2O_{23}$

Peso molecular: 1096,95

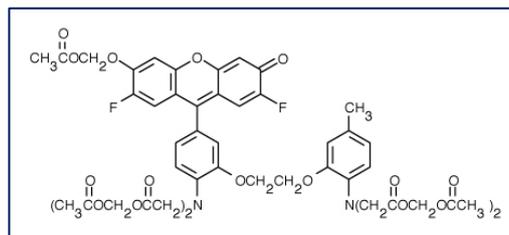


Figura 36. Fórmula del Fluo-4 AM.

Este indicador aumenta su fluorescencia al unirse a Ca^{2+} y se utiliza para cuantificar concentraciones celulares de Ca^{2+} en el rango de 100 nM a 1 μ M. En la Figura 36 se esquematiza su fórmula estructural. Debido a que su pico de excitación se encuentra a los 488 nm genera una emisión de la fluorescencia sustancialmente más brillante al utilizarse con excitación por láser de iones argón u otras fuentes junto con el conjunto de filtros de fluorescencia estándar. El Fluo-4 AM es muy adecuado para aplicaciones fotométricas y de imágenes que hacen uso de microscopía confocal. En la Figura 37 se exhibe el espectro del indicador.

Longitud de onda de excitación (λ_{Ex}) ~494nm

Longitud de onda de emisión (λ_{Em}) ~506nm

Kd: 335 μ M.

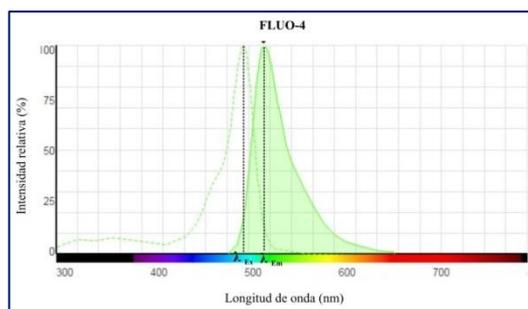


Figura 37. Espectro de excitación y emisión del Fluo-4 AM

7.2. CARGA DE LOS CORAZONES CON LOS INDICADORES FLUORESCENTES.

7.2.1. Rhod-2 AM, Mag-Fluo-4 AM y Fluo-4 AM.

Se mezclaron 50 μg de Rhod-2 AM con 45 μl de una solución de Pluronic F-127[®] (copolímero surfactante no iónico que facilita la carga del indicador) diluido en DMSO al 5% (dimetilsulfóxido, disolvente orgánico), se agitó en vórtex y luego se diluyó en Tyrode normal hasta una concentración de 43 μM . Una vez preparado el indicador se procedió a trabajar con la menor iluminación ambiente posible a fin de evitar el fotoblanqueo (“*photobleaching*” en inglés, referido a la destrucción fotoquímica del fluoróforo). Luego de un periodo de estabilización y de verificar la correcta perfusión del corazón, se cambió la solución de perfusión a la solución del indicador disuelto en Tyrode. Para prevenir la precipitación del indicador, se hizo fluir al mismo a través de un dispensador microgotero y cada gota se deslizó a través de la pared de una cámara de 5 ml saturada con O_2 100%. Se recirculó el indicador durante aproximadamente 25 minutos a 1 ml/min a temperatura ambiente, y luego se perfundió el corazón con Tyrode normal (10 minutos) sin indicador para lavar el indicador remanente previo el inicio del registro de la fluorescencia.

El indicador Mag-Fluo-4 AM se preparó de la misma manera pero se perfundió un tiempo más prolongado (40 min) para permitir una mejor difusión al RS y posterior unión de Ca^{2+} del mismo. Aunque este indicador se desesterifica en el sarcoplasma y en el RS, los miocitos pueden extruir la fracción citosólica. Esta extrusión del indicador se puede lograr por el simple aumento de la temperatura a 37°C. A esta temperatura, la fracción citosólica se elimina por unión a un transportador ABC como una proteína de membrana. Esta proteína no está presente en la membrana del RS. Por tanto, luego de haber aumentado la temperatura hasta 37 °C, la fluorescencia registrada utilizando la técnica PLFFM es principalmente un resultado de la unión del indicador con Ca^{2+} el dentro del RS.

El indicador Fluo-4 AM se preparó de la misma manera que el Mag-Fluo-4 AM.

7.2.2. Di-8-ANEPPS

Se disolvieron 10 μg del indicador potenciométrico Di-8-ANEPPS (lío­filizado) con 45 μl de la solución de Pluronic F-127[®] en DMSO 5%. Luego se agregó esta solución a 15 ml de Tyrode normal para obtener una concentración de 1 μM . La solución de Tyrode con el indicador se perfundió continuamente durante 25 minutos a una velocidad de 1 ml/min a temperatura ambiente. Luego del proceso de carga, se perfundió al corazón con Tyrode normal durante 10 minutos para remover el indicador extracelular excedente y comenzar las mediciones.

Para los experimentos con fluorescencia y con microelectrodos se agregó al Tyrode el desacoplante mecánico Bleblistatina (actúa bloqueando las cabezas de miosina en un complejo con baja afinidad por la actina) 5 μM , a fin de minimizar los artefactos de movimiento en el registro.

7.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE CAMPO LOCAL PULSADO (PLFFM)

La fuente de luz utilizada para la excitación de los fluoróforos consistió en un láser verde (532 nm para el Rhod-2 AM y Di-8-ANEPPS) y un láser azul (473 nm para Mag-Fluo-4 AM). La luz de excitación se enfocó en la fibra óptica multimodo (400 μm de diámetro para el láser verde y 200 μm para el láser azul, Thorlabs, EE.UU.) mediante una lente convergente para transmitir la luz de excitación a la superficie del corazón. Esta luz excitó las moléculas del fluoróforo en el volumen de iluminación del campo de la fibra óptica. La luz emitida desde el corazón fue llevada a través de la misma fibra óptica, filtrada para eliminar el componente de excitación reflejado y se enfocó en un fotodiodo de avalancha. Este fotodiodo se conectó a un convertor integrador voltaje – corriente controlado por un procesador de señal digital. Luego la señal fluorescente recogida se digitalizó, se filtró y se analizó mediante un software comercial descrito anteriormente. En la Figura 38 se muestran los componentes principales de este sistema.

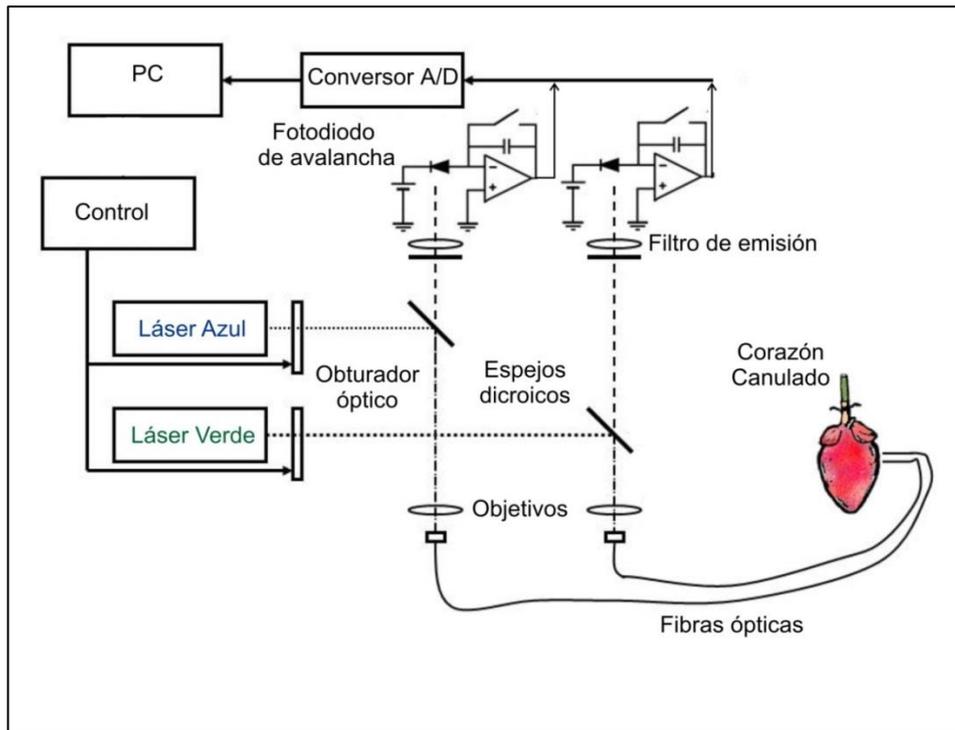


Figura 38. Sistema PLFFM. (Modificado de Mejía-Alvarez y col., 2003).

Una vez que el corazón ya estuvo estabilizado, cargado y lavado el excedente del indicador, se posicionó la fibra óptica a través del micro manipulador lateral a VI tocando el epicardio. Luego de visualizada la señal se procedió a registrarla con el sistema de adquisición descrito anteriormente (Powerlab, AD Instruments). Los protocolos utilizados con esta técnica fueron los siguientes.

7.4. PROTOCOLO DE RESTITUCIÓN DE LA LIBERACIÓN DE Ca^{2+} (RLC):

Luego de una liberación de Ca^{2+} desde el RS, debe transcurrir un cierto tiempo, antes de que ocurra una segunda liberación de igual amplitud. Esta refractariedad de la liberación de Ca^{2+} se define como la recuperación tiempo-dependiente (restitución) de la liberación de Ca^{2+} (RLC). El objetivo de este protocolo fue estudiar la RLC, para obtener una de las características de la dinámica de Ca^{2+} intracelular en cada cepa. Las curvas de RLC fueron generadas por la aplicación de un pulso extrasistólico adicional a distintos tiempos durante el intervalo diastólico regular. La recuperación fraccional de la liberación de Ca^{2+} fue calculada como la relación entre la amplitud del transitorio de Ca^{2+} posterior y anterior al pulso extrasistólico (ver fórmula más abajo). Se procedió al análisis de estos datos mediante ajuste a una curva exponencial, del cual se obtuvo la constante de tiempo de la RLC de los diferentes grupos estudiados (Figura 39).

$$\% \text{ RLC: } A2/A1 * 100$$

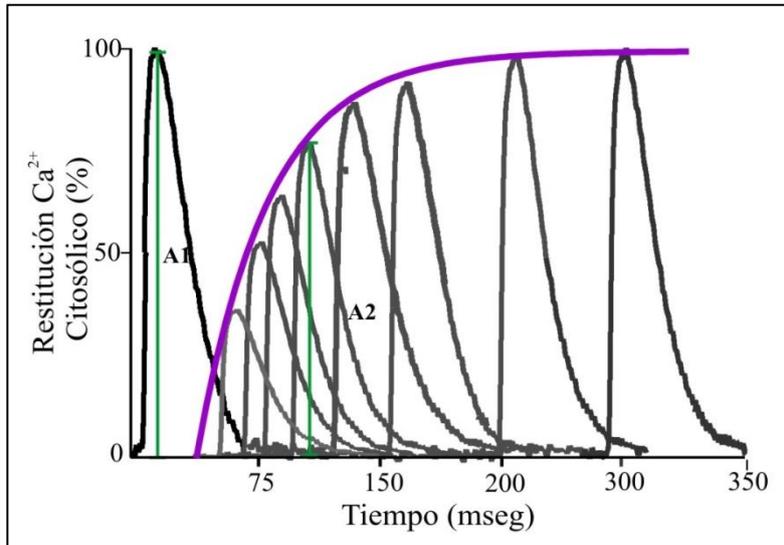


Figura 39. Protocolo para obtención curvas RLC.

7.5. PROTOCOLO DE INDUCCIÓN DE ARRITMIAS POR ESTRÉS (ALTA FRECUENCIA Y ALTO Ca^{2+} EXTRACELULAR).

Este protocolo consistió en someter a los corazones cargados con indicador fluorescente a un periodo breve de estrés que implicó la perfusión durante 2 minutos con Tyrode con concentración elevada de Ca^{2+} extracelular (6 mM) y estimulación eléctrica con frecuencia elevada (12 Hz) durante los últimos 5 segundos de esta etapa de dos minutos (denominado tren de alta frecuencia). En estas condiciones se evaluó la incidencia y frecuencia de latidos ectópicos y de taquicardia ventricular (TV). El objetivo perseguido fue evaluar la respuesta de las diferentes cepas mutantes de ratón al estrés y utilizar estos datos para dar respuesta a nuestra hipótesis. Este protocolo se esquematiza en la Figura 40.

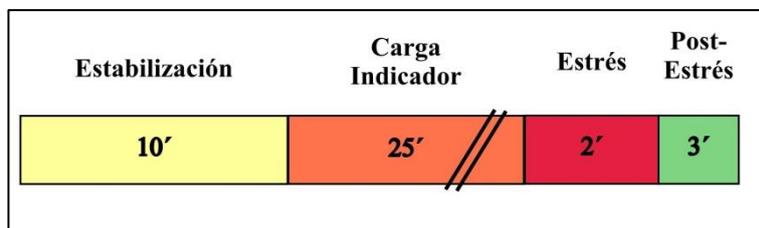


Figura 40. Protocolo de arritmias bajo estrés.

8. ONDAS DE Ca^{2+} EN EL CORAZÓN INTACTO

Para los registros de ondas de Ca^{2+} se utilizó un microscopio confocal (Olympus Fluoview FV1000) con un objetivo 40X con una distancia de trabajo larga y una apertura numérica grande (0,80). Los corazones se perfundieron tal como se mencionó anteriormente para PLFFM, con Fluo-4 AM 0,1 μM luego de que la frecuencia cardíaca espontánea fuera regular. Después de 30 minutos de perfusión con el indicador a temperatura ambiente, la solución se cambió a Tyrode normal, y la temperatura se incrementó a 37°C durante 10 minutos luego de trasladarla cámara de perfusión a la platina del microscopio confocal. Se obtuvieron registros de barrido lineal de la epicapa ventricular izquierda, como se describió anteriormente (Mattiazzi y col., 2015) durante la pre-isquemia y durante los primeros 10 min de reperfusión de los corazones después de 15 min de isquemia sin flujo.

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En cada uno de los diferentes protocolos se estudiaron diferentes características y resultados que se describen a continuación.

9.1. PARÁMETROS DE Ca^{2+} INTRACELULAR

A partir de los resultados obtenidos del estudio de los transitorios de Ca^{2+} citosólico e intra RS se analizó:

$t_{1/2}$: Tiempo (expresado en ms) transcurrido entre el pico máximo y la disminución a la mitad de la amplitud de la fluorescencia. Este parámetro se utiliza para estudiar la celeridad de la relajación.

τ (tau**):** Constante de relajación (ms). Es la constante de tiempo del ajuste de la porción de relajación del transitorio con caída exponencial (ver Figura 41). Expresa la constante de tiempo a la que se relaja el corazón. Así, un menor valor de τ indica una relajación más rápida, y viceversa.

dF_{max}/dt : Máxima velocidad de aumento de la amplitud de la fluorescencia. Expresa la velocidad de aumento de la fluorescencia (debida al Ca^{2+} en nuestro caso).

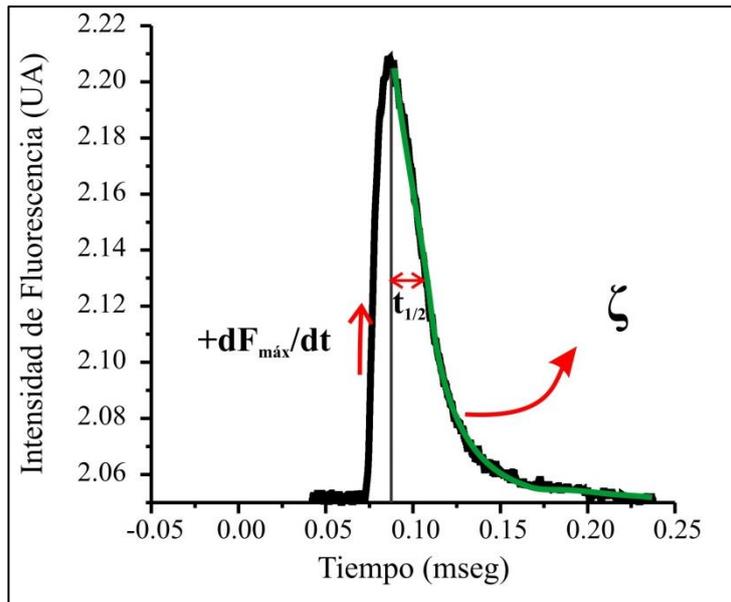


Figura 41. Parámetros estudiados en los transitorios de Ca^{2+}

RLC: Restitución de la liberación de Ca^{2+} (ms). Constante de tiempo de la curva exponencial obtenida luego del análisis del protocolo de restitución. Ver Figura 42.

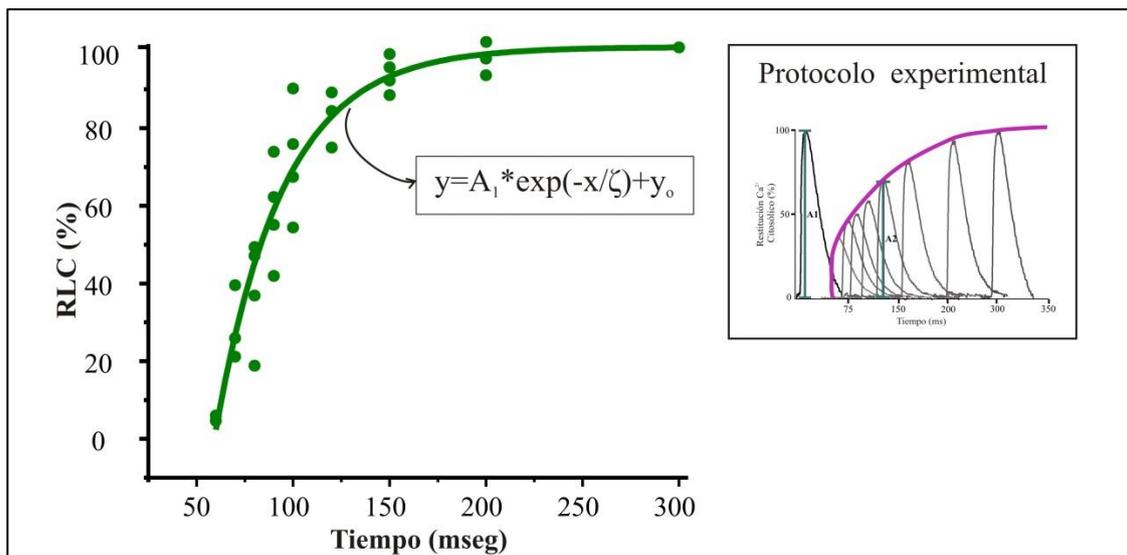


Figura 42. Cálculo de constante de RLC.

Como ya se explicó, luego de la liberación de Ca^{2+} por el RS, el sistema de liberación entra en un período refractario durante el cual no responde a la estimulación por el Ca^{2+} citosólico. Este período depende entre otras variables del contenido de Ca^{2+} del RS y de las características de los RyR2 (Radwański y col., 2013; Mazzocchi y col., 2016) y se utilizó para caracterizar la dinámica del Ca^{2+} intracelular en las diferentes cepas.

9.2. POTENCIALES DE ACCIÓN

De los PA se analizó:

APD: Duración del ancho del PA (ms).

APD₂₀: Duración del PA al 20% de la repolarización eléctrica (ms).

APD₅₀: Duración del PA al 50% de la repolarización eléctrica (ms).

La Figura 43 resume estas variables.

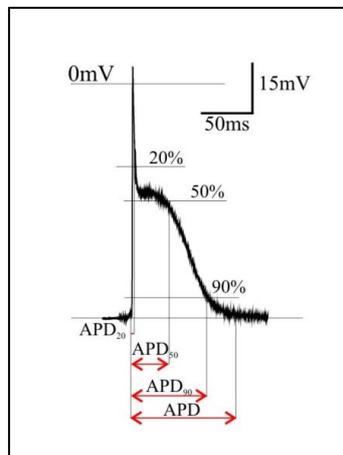


Figura 43. Cálculo de parámetros en PAs.

RPA: restitución del PA. Constante de tiempo de la curva obtenida como resultado del protocolo de restitución de la amplitud del PA. Esta medida permite evaluar el tiempo requerido para que se restituyan las propiedades de la membrana plasmática para generar otro potencial de acción.

Incidencia de latidos ventriculares prematuros (LVP). Luego del protocolo de estrés, del periodo de isquemia en corazones perfundidos o del estímulo catecolaminérgico en animales intactos, se observó la ocurrencia de latidos ventriculares prematuros y se expresó la incidencia (cantidad de corazones con ocurrencia de LVP/total de corazones utilizados de cada cepa) en porcentaje (%) del total.

Frecuencia de latidos ventriculares prematuros. Se contabilizó la ocurrencia de LVP y se lo dividió por la duración del periodo de observación de 3 minutos. Se expresó como latidos/minuto (lat/min).

Incidencia de taquicardia ventricular (TV): Se observó la ocurrencia de TV y la incidencia se expresó como cantidad de corazones con TV/total de corazones de cada cepa en porcentaje (%) del total.

Frecuencia de la TV: Se contabilizó la ocurrencia de eventos de TV y se lo dividió por la duración del periodo de observación. Se expresó como latidos/minuto (lat./min).

9.3. MICROSCOPIA CONFOCAL

Las chispas o destellos de Ca^{2+} se midieron usando el complemento "Sparkmaster" para ImageJ (Picht y col., 2007). Las ondas, mini-ondas y *warks* de Ca^{2+} , fueron contadas y clasificadas visualmente, según las siguientes definiciones: Una *onda* propagada de Ca^{2+} se definió como un frente de onda continua en la imagen de exploración lineal visualizada como una línea fluorescente robusta que se propaga a través del ancho total del miocito sin fragmentarse o romperse. Una *mini-onda* se definió como una línea fluorescente que se rompe, sin propagarse a través de la totalidad de la célula. Un *wark* se definió como una onda de Ca^{2+} fragmentada en forma de collar de cuentas, que no se propaga a lo largo de la longitud de la célula.

10. ESTADÍSTICA

Las variables continuas se expresaron como media \pm ESM (error estándar de la media) y se evaluaron con la prueba t de Student para muestras no apareadas o por análisis de la varianza (ANOVA) seguida de la prueba *post hoc* de Tukey para comparar la diferencia entre grupos. La prueba Mann–Whitney *U* se utilizó para datos que no siguen una distribución normal. Una diferencia se consideró significativa cuando el valor de *P* fue $<0,05$. Los datos categóricos se expresaron como porcentajes y se compararon mediante la prueba exacta de Fischer.

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES SDKO

1.1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS RATONES SDKO

El genotipo de los ratones WT y SDKO se confirmó por análisis de PCR usando el ADN extraído de la cola de ratón y cebadores específicos para detectar las mutaciones específicas PLNKO y S2814D (Luo y col., 1994; Van Oort y col., 2010).

Luego se procedió a caracterizar a los ratones SDKO desde el punto de vista estructural, mecánico, de la dinámica de Ca^{2+} y de los PAs por comparación con los ratones WT.

El análisis de las secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina (realizadas en la Cátedra de Patología de la Facultad de Ciencias Médicas de La Plata) demostró que las dimensiones de las paredes cardíacas en ratones SDKO de 2 a 4 meses de edad fueron similares respecto a los WT: espesor máximo de pared de VI: $1,20 \pm 0,30$ vs $1,65 \pm 0,20$ mm, espesor mínimo de pared de VI: $0,96 \pm 0,09$ y $1,05 \pm 0,12$ mm, espesor del septum: $1,30 \pm 0,14$ y $1,23 \pm 0,19$ μ m, respectivamente (n=3). Tampoco se detectaron diferencias significativas en el diámetro transversal de los miocitos ventriculares entre los ratones WT ($17,40 \pm 1,03$ μ m) vs los ratones SDKO ($15,50 \pm 0,32$ μ m), n=134 y 139 miocitos, respectivamente de 3 corazones, ni en la fibrosis intersticial $4,0 \pm 0,5\%$ (WT) vs $4,5 \pm 0,6\%$ (SDKO) (n = 3). En la Figura 44A se muestra un corte transversal de corazón de ratón SDKO y de WT y en la Figura 44B y C los valores promedios de los parámetros estructurales nombrados en el párrafo anterior.

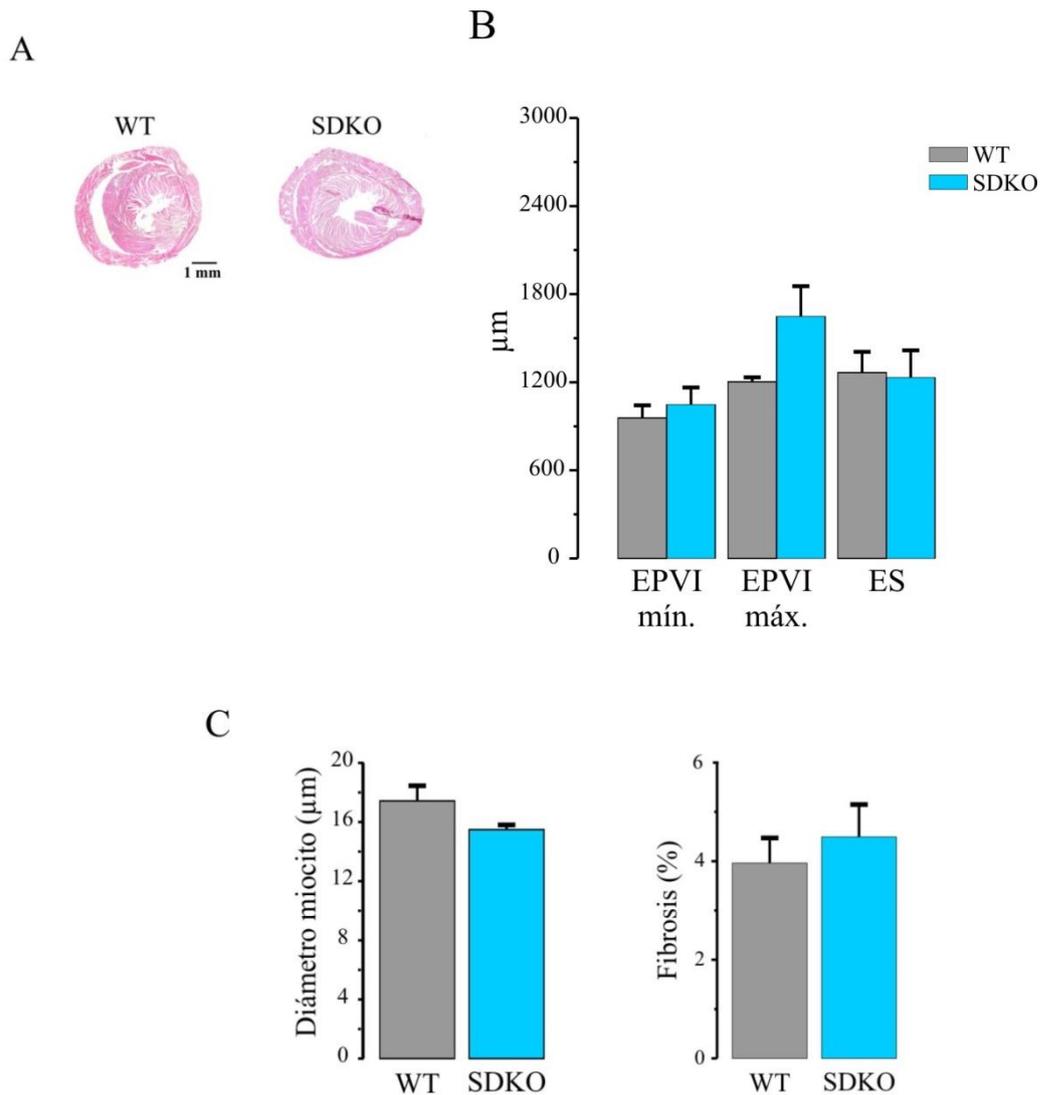


Figura 44. Características estructurales de los ratones SDKO. No se encontraron diferencias significativas en la estructura cardíaca de los ratones SDKO vs los WT. A. Sección transversal típica teñida con hematoxilina y eosina de corazón de ratón WT y de SDKO. B. Valores promedios de parámetros estructurales. EPVI máx.: espesor de la pared del VI máxima, EPVI mín.: espesor de la pared del VI mínima, ES: espesor septal. C. Valores promedios del diámetro de miocitos (panel izquierdo) y fibrosis intersticial (panel derecho). n=3.

En la Tabla 2 se puede ver que la estructura y función cardíaca determinadas por ecocardiografía fueron similares en ratones WT y SDKO jóvenes (3 meses de edad). Por el contrario, a los 6 meses, los ratones SDKO mostraron un aumento en el diámetro de final de diástole, espesor sistólico ventricular de la pared del septum y espesor de la pared posterior del VI vs los ratones WT. Un aumento en estos parámetros se había observado previamente en ratones S2814D a los 12 meses de edad (Van Oort y col., 2010).

	3 meses de edad		6 meses de edad	
	WT	SDKO	WT	SDKO
n	4	4	4	4
Frecuencia cardíaca (lpm)	651,82 ± 22,80	707,11 ± 17,03	618,82 ± 25,8	623,68 ± 7,89
Fracción eyección (%)	92,86 ± 0,38	94,54 ± 2,43	91,92 ± 1,00	94,70 ± 0,30
LVFS (%)	31,08 ± 0,49	34,51 ± 3,67	30,66 ± 1,01	34,19 ± 1,49
ESD (mm)	1,02 ± 0,03	0,95 ± 0,06	1,02 ± 0,02	1,00 ± 0,03
EDD (mm)	2,83 ± 0,07	3,02 ± 0,15	2,72 ± 0,09	3,13 ± 0,11* ^ψ
IVSs(mm)	1,39 ± 0,04	1,37 ± 0,05	1,26 ± 0,09 [#]	1,60 ± 0,07* ^ψ
IVSd (mm)	0,75 ± 0,01	0,68 ± 0,02*	0,70 ± 0,01	0,79 ± 0,03
LVPWs (mm)	1,61 ± 0,08	1,59 ± 0,12	1,26 ± 0,09 [#]	1,60 ± 0,07* ^ψ
LVPWd (mm)	0,90 ± 0,04	0,74 ± 0,02*	0,68 ± 0,03 [#]	0,85 ± 0,04*

Tabla 2. Datos estructurales de ratones SDKO. Los datos están expresados como promedio ± ESM. Significado de las siglas en inglés. LVFS: fracción de acortamiento del VI. ESD/EDD: diámetro de fin de sístole/diástole, IVSs/IVSd: espesor de la pared de septum interventricular en sístole/diástole, LVPWs/LVPWd: espesor de la pared posterior del VI en sístole/ diástole. * $P < 0,05$ WT vs. SDKO, # $P < 0,05$, 3 meses vs. 6 meses WT; ψ $P < 0,05$, 3 meses vs. 6 meses SDKO.

Estos resultados muestran que la estructura cardíaca de la cepa SDKO no presenta diferencias respecto a los ratones WT. Las diferencias encontradas a los 6 meses en cuanto a diámetro de fin de diástole, espesor sistólico ventricular de la pared del septum y espesor de la pared posterior del VI es un resultado esperable para esta cepa ya que una de las cepas que da origen a los SDKO es justamente la cepa S2814D para la cual se ha descrito este incremento en las características recién mencionadas estando en concordancia también con experimentos de sobreexpresión de CaMKII en los que se demostró la participación de la misma en el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Zhang y col., 2003; Van Oort y col., 2010).

1.2. CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LOS RATONES SDKO.

Luego, se estudiaron las características mecánicas de los corazones perfundidos de las diferentes cepas. En los ratones SDKO la *presión desarrollada por el ventrículo izquierdo* (PDVI) fue similar a los ratones S2814D. Sin embargo, la *máxima velocidad de subida de la PDVI* (+dP/dt máx.) y la *máxima velocidad de relajación* fueron significativamente más altas en los ratones SDKO vs los S2814D aunque sin alcanzar los niveles de la cepa PLNKO. El *tiempo medio de relajación* ($t_{1/2}$) fue significativamente más corto que los ratones S2814D y similar a los ratones PLNKO. Estos resultados se muestran en la Figura 45.

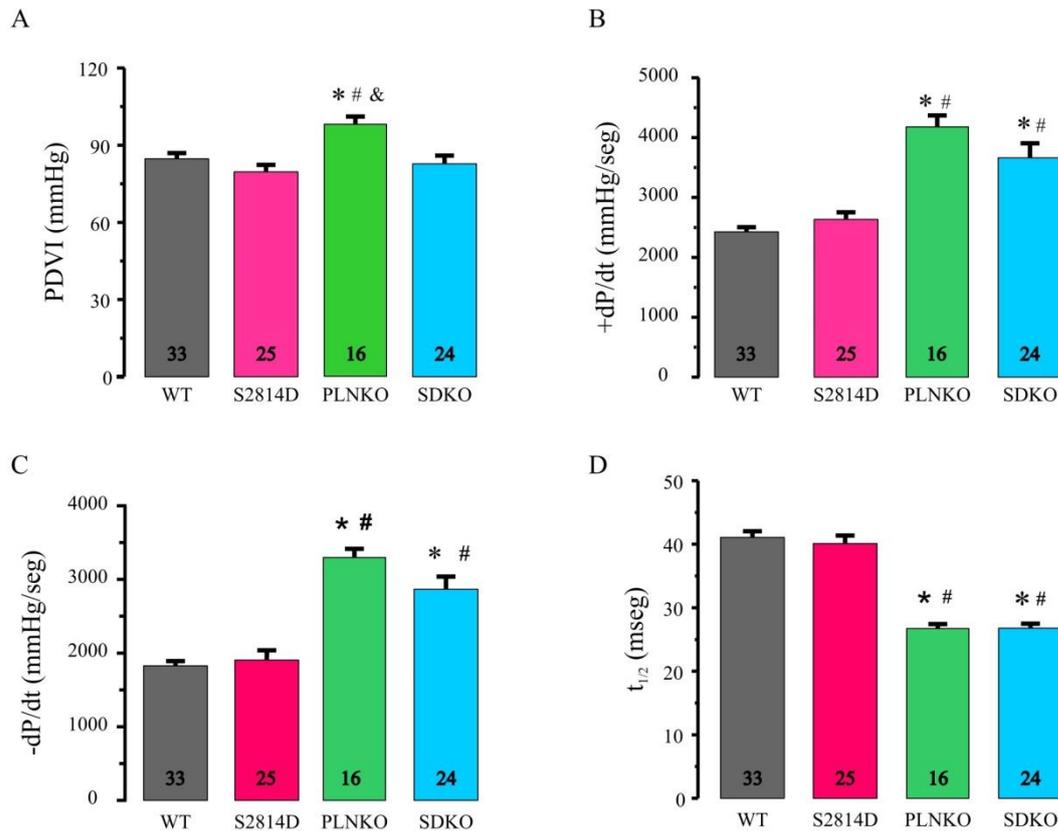


Figura 45. Características mecánicas de los corazones de ratones SDKO. A. Presión desarrollada por el VI (PDVI) durante perfusión normal. B. Máxima velocidad de aumento de la PDVI. C. Máxima velocidad de relajación de la PDVI. D. Tiempo medio de relajación. * $P < 0,05$ vs. WT, # vs. S2814D, & vs. PLNKO.

En conjunto estos resultados indican que los ratones SDKO combinan a nivel funcional el aumento en la recaptura de Ca^{2+} por la ablación de PLN (que se manifiesta por una mayor velocidad de relajación), y el aumento en la liberación de Ca^{2+} (que se manifiesta por una mayor velocidad de desarrollo de la presión) típica de la pseudofosforilación de los ratones S2814D.

2. CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA DE Ca^{2+} DE LOS RATONES SDKO

Para caracterizar la dinámica de Ca^{2+} de los ratones doble mutantes y al mismo tiempo poder compararlos con las demás cepas se midieron los transitorios de Ca^{2+} citosólico e intra RS en el epicardio del corazón intacto bajo estimulación eléctrica, en todas las cepas estudiadas. Estos resultados se obtuvieron utilizando la técnica de fluorescencia PLFFM tal como se describe en Materiales y Métodos.

Se encontró que los ratones PLNKO y SDKO presentaron un *tiempo medio* de relajación del transitorio de Ca^{2+} citosólico menor que los WT y los S2814D y a su vez, los transitorios de Ca^{2+} de los corazones de ratones S2814D se relajaron más lentamente en comparación a las demás cepas, como se muestra en la Figura 46A. En cuanto a la relajación de los transitorios de Ca^{2+} del RS (Figura 46 B), se encontró que el *tiempo medio* de relajación en los ratones PLNKO fue significativamente menor que en las demás cepas. Este resultado pone de manifiesto que tanto la cepa PLNKO como la doble mutante, SDKO, poseen una relajación aumentada en comparación con las otras cepas. Este resultado es consistente con los obtenidos por otros trabajos respecto a los PLNKO (Li y col., 2000) y con los datos mecánicos mostrados en la Figura 45.

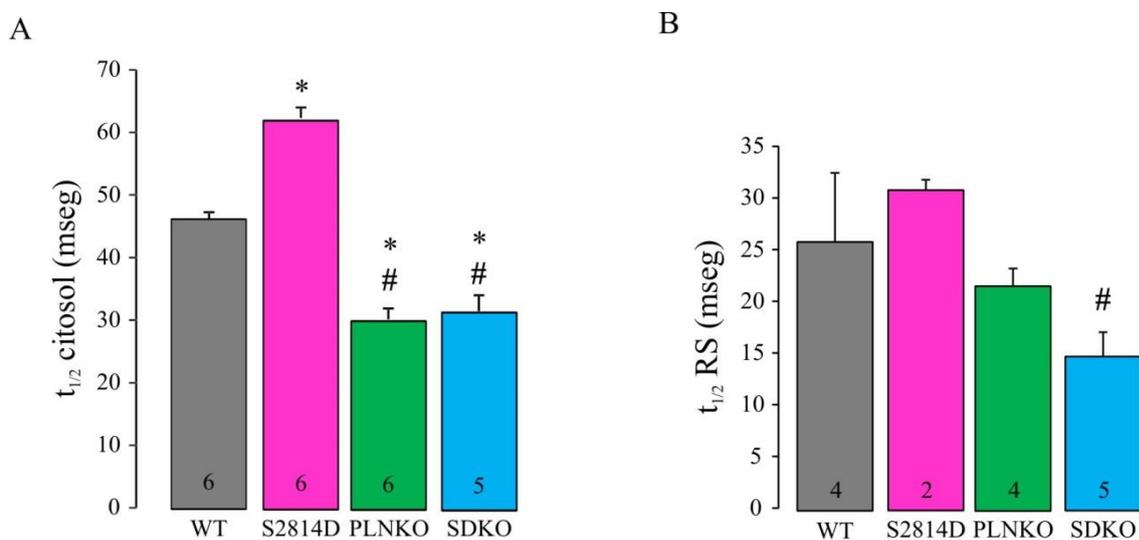


Figura 46. Tiempo medio de relajación de transitorio de Ca^{2+} citosólico e intra RS. A. Tiempo medio de relajación citosólico medido con Rhod-2. B. Tiempo medio de relajación intra RS medido con Mag-Fluo-4 AM. Las dos cepas con ablación de PLN, PLNKO y SDKO, poseen una relajación más rápida que las cepas WT y S2814D. * $P < 0,05$ vs. WT, # vs. S2814D.

Otro parámetro relacionado con la relajación del transitorio de Ca^{2+} es la constante de relajación *Tau* (constante de decaimiento exponencial). Del mismo modo que para el $t_{1/2}$, se encontró que la constante de relajación tau de los transitorios de Ca^{2+} citosólico e intra RS fue significativamente menor en los ratones SDKO con respecto a los S2814D y WT y similar a los PLNKO, tal como se observa en la Figura 47A. y B. La velocidad de relajación, medida a través de la inversa de la constante de relajación tau, fue mayor en los ratones SDKO y PLNKO y menor en los ratones S2814D y WT como se observa en la Figura 47C.

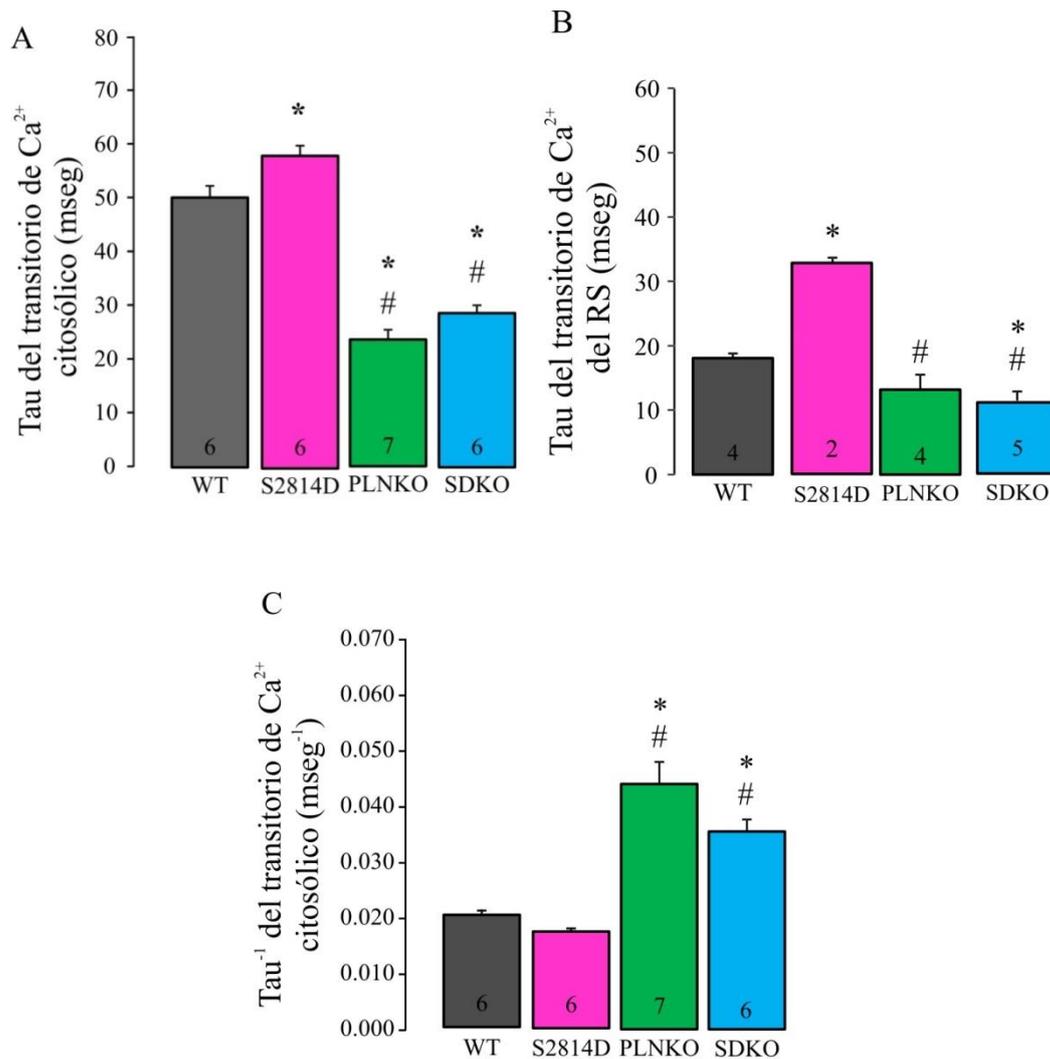


Figura 47. Constante de tiempo de relajación tau y constante de velocidad de relajación tau⁻¹. A. Constante de relajación citosólica medida con Rhod-2 AM. B. Constante de relajación medida en el RS con Mag-Fluo-4 AM. C. Velocidad de relajación citosólica evaluada a través de la inversa de tau. * P<0,05 vs. WT, # vs. S2814D.

Otra de las características estudiadas fueron los tiempos de restitución de la liberación de Ca²⁺ (RLC). Este parámetro indica el tiempo que se necesita luego de un transitorio de Ca²⁺, para que se produzca otro transitorio de igual magnitud. Durante el tiempo de restitución el Ca²⁺ recicla: luego de su liberación por el RyR2, es recapturado por la SERCA2a y nuevamente llevado a los sitios de liberación, los RyR2, para ser liberado en el latido siguiente. Si bien los mecanismos que determinan y regulan la RLC no están totalmente aclarados, éstos han sido relacionados al contenido de Ca²⁺ del RS, y/o la velocidad de la recaptura de Ca²⁺ por el mismo, así como a la sensibilidad de los RyR2 al Ca²⁺. Por ejemplo, se demostró que una mayor actividad de la SERCA aumenta la velocidad de RLC (Ramay y col., 2011). Además en ratones carentes de calsequestrina, el buffer de Ca²⁺ principal dentro del RS, se observó una aceleración en la RLC, posiblemente por aumento del Ca²⁺ libre dentro del RS (Knollmann y col., 2006). La RLC es una propiedad celular fundamental, ya que latido a latido

es determinante de la estabilidad de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . La disminución de RLC se ha asociado con arritmias, en tanto que su aumento con alternancias ventriculares (Kornyejev y col., 2012; Liu y col., 2012).

En nuestro estudio observamos que la ablación de PLN en las cepas PLNKO y SDKO produjo una disminución del tiempo de restitución de la liberación de Ca^{2+} (RLC), consistente con que el aumento de la recaptura de Ca^{2+} disminuye la refractariedad de los RyR2 (Huser y col., 1998; Szentesi y col., 2004), es decir que el Ca^{2+} recicla más rápidamente en comparación con las cepas sin ablación de la PLN. En la Figura 48A se muestra las curvas de la RLC obtenidas en las 4 cepas estudiadas y en la Figura 48B los valores promedios de las constantes de tiempo de la RLC calculadas como se describió en Materiales y Métodos.

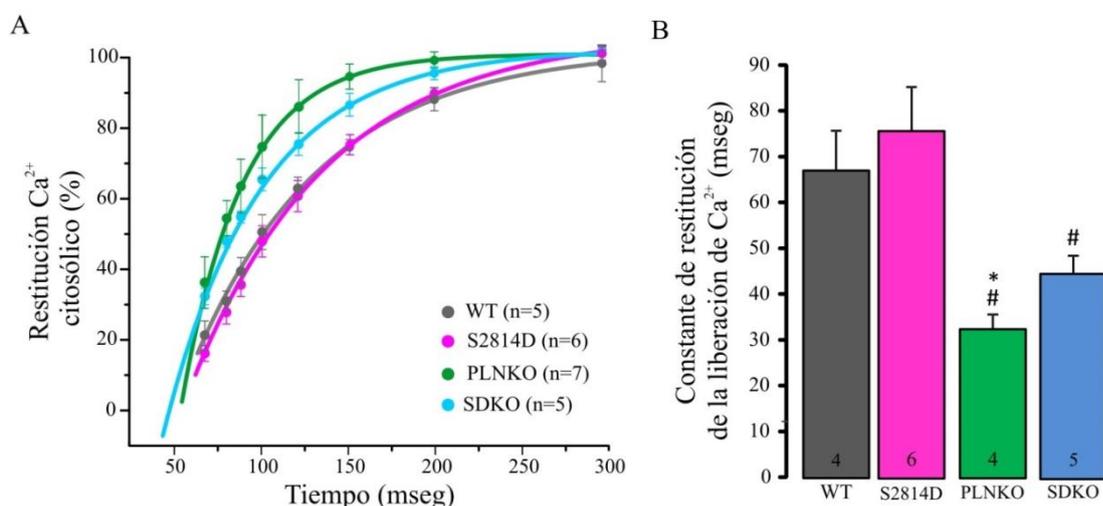


Figura 48. Restitución de la liberación de Ca^{2+} (RLC) citosólico. A. Curvas exponenciales de la restitución de Ca^{2+} de los transitorios citosólicos. B. Constantes de tiempo de la RLC para cada cepa. * $P < 0,05$ vs. WT, # vs. S2814D.

3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PA DE LOS RATONES SDKO

También se estudió y caracterizó la configuración de PA en S2814D y SDKO (Figura 49). El PA fue similar para ambos tipos de ratones. Se observó además que la duración del PA al 50% de la repolarización (APD50) tendió a ser más largo en los SDKO en comparación con los S2814D, $41,5 \pm 4,7$ ms ($n=6$) vs. $30,1 \pm 4,7$ ms ($n=7$), respectivamente, aunque sin llegar a niveles significativos. Esta tendencia está en concordancia con la prolongación del intervalo QT de los animales SDKO que habíamos demostrado en un trabajo previo (Mazzocchi y col., 2016). La Figura 49A muestra los trazos representativos de las cepas analizadas. En la Figura 49B se muestran los resultados de la APD20 y APD50.

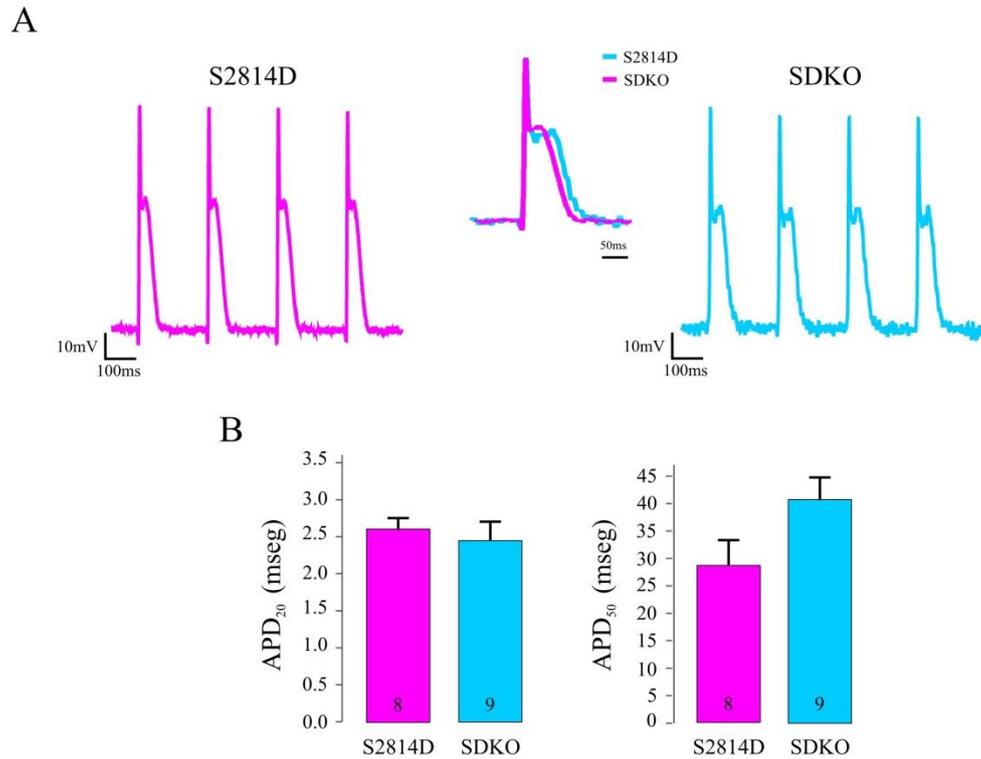


Figura 49. La ablación de PLN no genera cambios en la configuración del PA pero sí una tendencia a un incremento de la duración del mismo. A. Trazos representativos de PA en ratones S2814D y SDKO respectivamente en reposo. B. Duración del PA al 20% de la repolarización (APD 20, panel izquierdo) y al 50 % (APD50, panel derecho).

Las alteraciones observadas en las RLC podrían deberse total o parcialmente a alteraciones en la restitución del PA (RPA) y no estar determinadas por el manejo del Ca^{2+} . Para descartar esta posibilidad, se estudió la RPA. El protocolo, tal como se explica en el capítulo de Materiales y Métodos fue similar al empleado para estudiar la RLC. En este caso se utilizó el indicador fluorescente Di-8-ANEPPS sensible a los cambios en el potencial de membrana, y por ello es útil para evaluar los PA. En contraste a los resultados obtenidos para la RLC, la RPA no mostró ser diferente entre las cepas estudiadas. En la Figura 50 se muestra los resultados del estudio de la restitución eléctrica entre la cepa doble mutante y la cepa S2814D. En la Figura 50A se muestra los resultados de las curvas exponenciales de restitución eléctrica y en la Figura 50B se muestran los valores promedios de las constantes de las exponenciales obtenidas para la RPA.

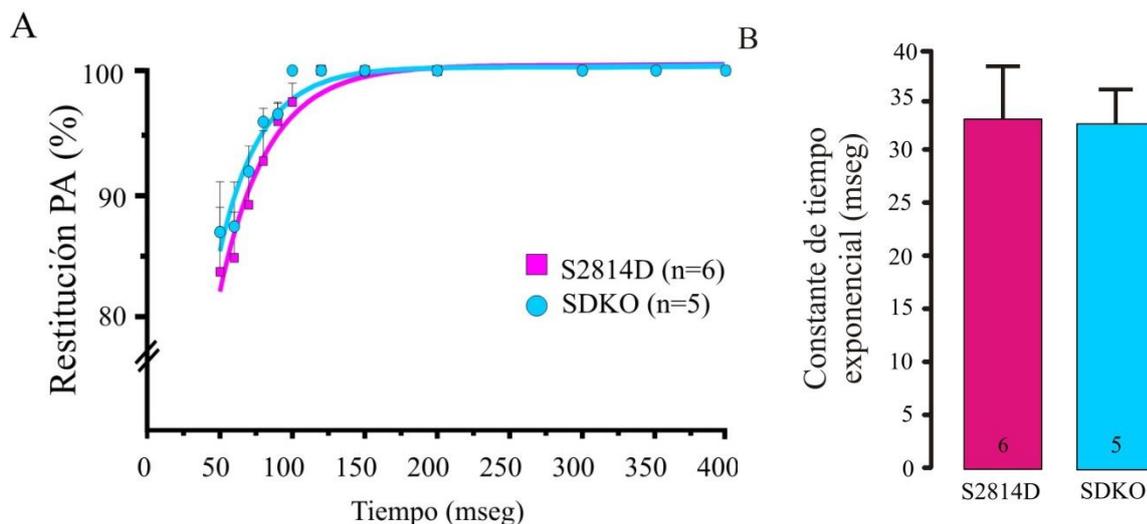


Figura 50. Restitución eléctrica. A. Curvas de restitución del PA. B. Valores promedio de las constantes de tiempo de la restitución del PA. La RPA es similar en ambas cepas.

Estos resultados indican que las alteraciones observadas en los tiempos de restitución de la liberación de Ca^{2+} citosólico en la Figura 48, se deben a una alteración de la recuperación del proceso de liberación de Ca^{2+} en sí mismo, y no a una alteración en la restitución del potencial de acción y sugieren un mayor riesgo de arritmias en las cepas PLNKO y SDKO.

4. LA ABLACIÓN DE LA FOSFOLAMBAN REDUJO LAS ARRITMIAS VENTRICULARES PROMOVIDAS POR LA FOSFORILACIÓN POR CaMKII DEL SITIO SER²⁸¹⁴ DE LOS RyR2 BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS

Luego de caracterizada la cepa doble mutante se prosiguió con el siguiente objetivo: evaluar los efectos del aumento en la recaptura de Ca^{2+} del RS en la propensión arritmogénica bajo estrés típica de la fosforilación de los RyR2 mediada por CaMKII. Se realizó el estudio de ECG *in vivo* a ratones de 3-4 meses de edad de las cepas S2814D y SDKO. Ambas cepas presentaron un ritmo cardíaco normal en reposo. Sin embargo cuando se estimuló a los ratones con una inyección IP de cafeína/epinefrina, la respuesta del ECG fue completamente diferente entre los ratones S2814D y los SDKO. En tanto que los ratones S2814D mostraron una incidencia alta de complejos ventriculares prematuros (PVC, sigla en inglés) de acuerdo a hallazgos previos (Van Oort y col., 2010), estos fueron significativamente menos frecuentes en los ratones SDKO (Figura 51A-C). Además, en los ratones S2814D se observó una incidencia alta de taquicardia bidireccional sostenida (presente en 4 de 5 ratones) que no se presentó en ninguno de los animales SDKO (6 ratones) (Figura 51D).

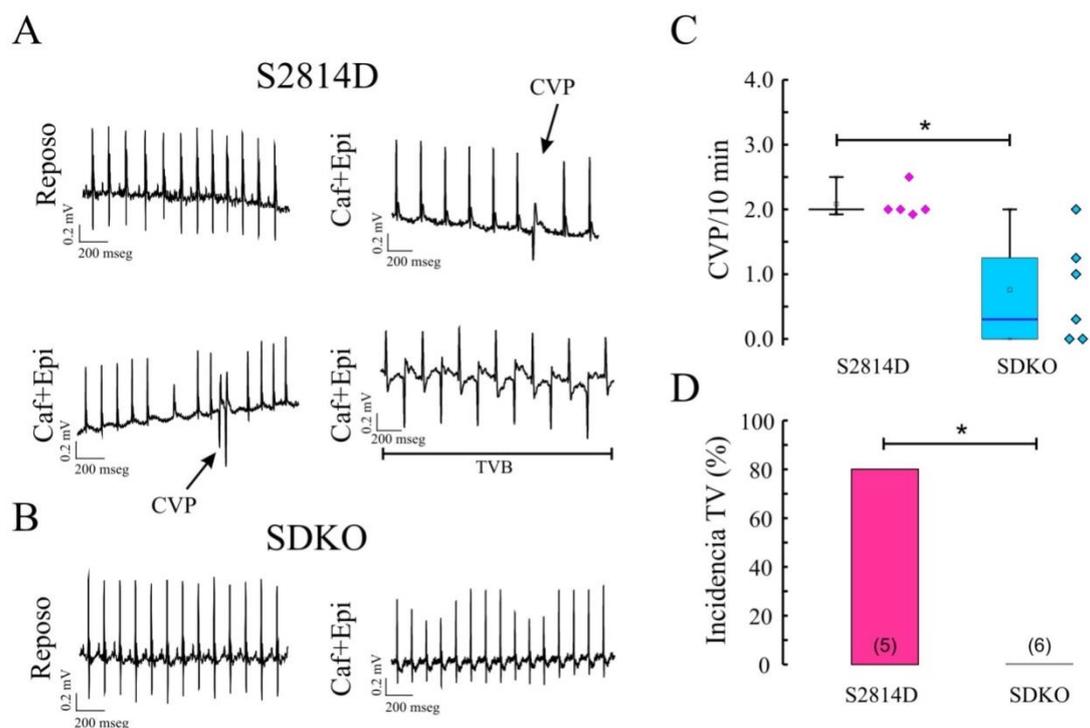


Figura 51. La ablación de PLN rescata de la propensión a arritmias ventriculares promovida por la fosforilación constitutiva del RyR2 en el sitio Ser²⁸¹⁴ dependiente de CaMKII *in vivo*. A y B. Trazos representativos de ECG en ratones S2814D y SDKO conscientes en reposo y post inyección IP de cafeína/epinefrina (Caf/Epi). Las flechas en los trazos de los S2814D indican complejos ventriculares prematuros (CVPs). Se observó taquicardia ventricular bidireccional (TVB) en la mayoría de los ratones S2814D, luego de estímulo con Caf/Epi. Los CVPs fueron pocos comunes y la TVB estuvo completamente ausente en los ratones SDKO. C y D. Gráfico de caja mostrando la frecuencia de los CVPs y la incidencia de la TV, respectivamente en los ratones S2814D y SDKO luego del estímulo con Caf/Epi. * $P < 0,05$ vs. S2814D.

Se realizaron además experimentos *ex vivo* para estudiar el efecto del aumento en la recaptura de Ca²⁺ del RS en la propensión arritmogénica típica de la fosforilación de los RyR2 mediada por CaMKII. Estos experimentos se realizaron en corazones aislados perfundidos pre cargados con el fluoróforo Di-8-ANEPPS, para evaluar el PA transmembrana en la capa epicárdica de los corazones intactos de los ratones (Mejía-Alvarez y col., 2003). Se sometió a los corazones de los ratones SDKO y S2814D a un protocolo arritmogénico (Bai y col., 2013; Mazzocchi y col., 2016): un tren de estímulos eléctricos de alta frecuencia (12Hz), en presencia de una concentración alta de Ca²⁺ extracelular (Ca²⁺6mM) seguido de un periodo de estimulación de 1Hz y Ca²⁺6mM.

La Figura 52 muestra trazos típicos (A y C) y resultados totales (Figura 52B y D) de esos experimentos. Durante los primeros 3 min luego del protocolo de tren de pulsos, los corazones S2814D usualmente no respondieron a la baja frecuencia de estimulación impuesta y mostraron una alta frecuencia espontánea (Figura 52A) y un incremento significativo de latidos ventriculares

premuros en comparación con los corazones SDKO y en la incidencia de períodos de taquicardia ventricular (TV) (S2814D, 63% vs. SDKO, 0%) (Figura 52B y D).

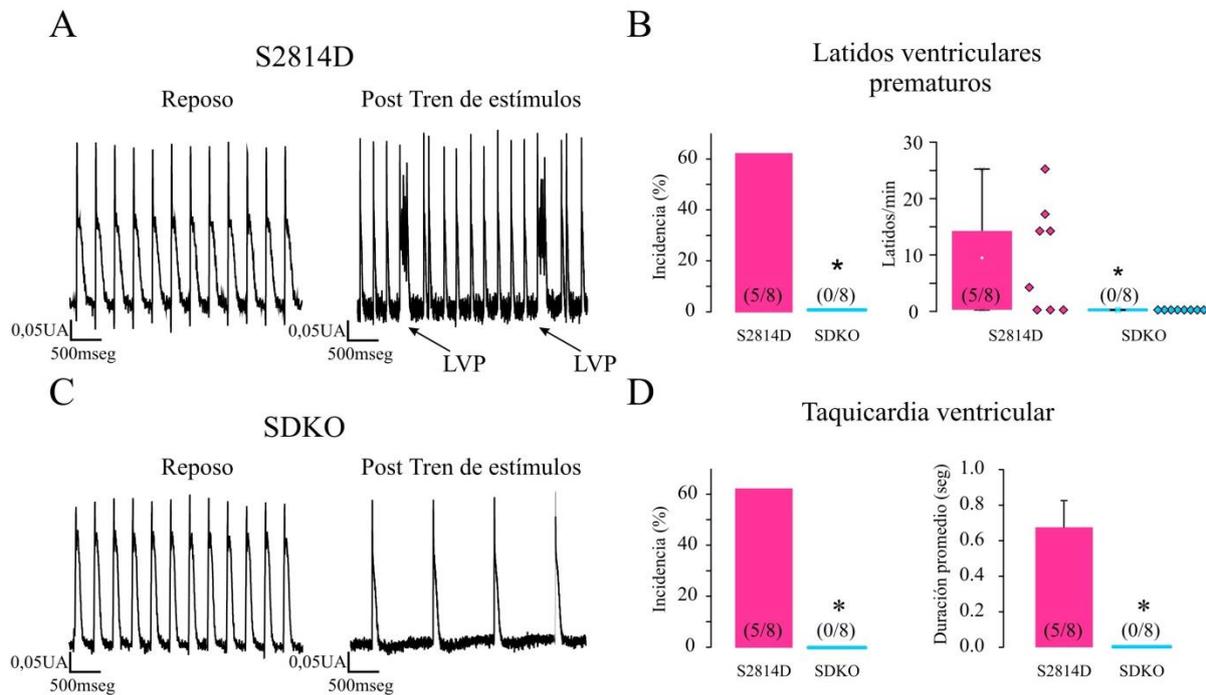


Figura 52. La ablación de la PLN rescata la propensión a arritmias ventriculares promovidas por la fosforilación constitutiva del sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 en corazones ex vivo. A y C. Trazos representativos de potencial de acción medido por fluorescencia (Di-8ANEPPS) en reposo y luego de un tren de alta frecuencia de estímulo en ratones S2814D heterocigotas y SDKO. Las flechas en A indican la ocurrencia de un latido ventricular prematuro (LVP). B. Incidencia (panel izquierdo) y frecuencia (panel derecho, dibujo de caja) de latido ventricular prematuro. D. Incidencia (panel izquierdo) y duración (panel derecho) de taquicardia ventricular. *P < 0,05 vs. S2814D.

En conjunto estos resultados muestran que el aumento en la recaptura de Ca²⁺ por el RS por ablación de la PLN previene las arritmias *in vivo* y *ex vivo* a la que son propensos los ratones S2814D.

5. LA ABLACIÓN DE LA FOSFOLAMBAN REDUJO LAS ARRITMIAS VENTRICULARES PROMOVIDAS POR LA FOSFORILACIÓN DE LA CaMKII DEL SITIO SER²⁸¹⁴ DE LOS RyR2 EN LA I/R.

Para evaluar los efectos del aumento de la recaptura de Ca²⁺ por el RS en la propensión arritmogénica típica de la fosforilación del sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 luego de un protocolo de isquemia y reperfusión se realizaron experimentos utilizando ratones de 3-4 meses de las cepas WT, S2814D y SDKO (n= 17 , n=14 y n= 9 respectivamente). Estos experimentos también se realizaron en corazones intactos perfundidos bajo estimulación eléctrica programada. Se midieron los PA utilizando microelectrodos intracelulares. La Figura 53 muestra los trazos representativos y la Figura 54 los resultados totales de este conjunto de experimentos. Durante los primeros 3 minutos de reperfusión luego de un periodo de

15 minutos de isquemia global, los corazones SDKO mostraron una menor incidencia a presentar latidos prematuros ventriculares en comparación con los corazones S2814D (WT, 70,5%; S2814D, 87,5% y SDKO, 33%) y una frecuencia de los mismos menor en comparación con los ratones S2814D y los ratones WT (S2814D, $4,38 \pm 0,91$ lat./3min; SDKO, $0,44 \pm 0,24$ lat./3min y WT, $4,47 \pm 0,38$ lat./3min).

Se debe notar que tanto la incidencia como la frecuencia de los latidos prematuros en los S2814D durante la reperfusión son sólo ligeramente superiores y no significativamente diferentes de las que presentaron los ratones WT. Aunque a primera vista este resultado podría parecer inesperado, se sabe que los ratones WT presentan arritmias de reperfusión asociadas a un aumento significativo de la fosforilación dependiente de CaMKII de RyR2 al inicio de la reperfusión (Said y col., 2011). Esta alteración, que no puede ocurrir en ratones S2814D debido a su estado permanentemente pseudofosforilado del Ser²⁸¹⁴ del RyR2, explicaría el comportamiento similar de ambas cepas en relación con las arritmias de reperfusión.

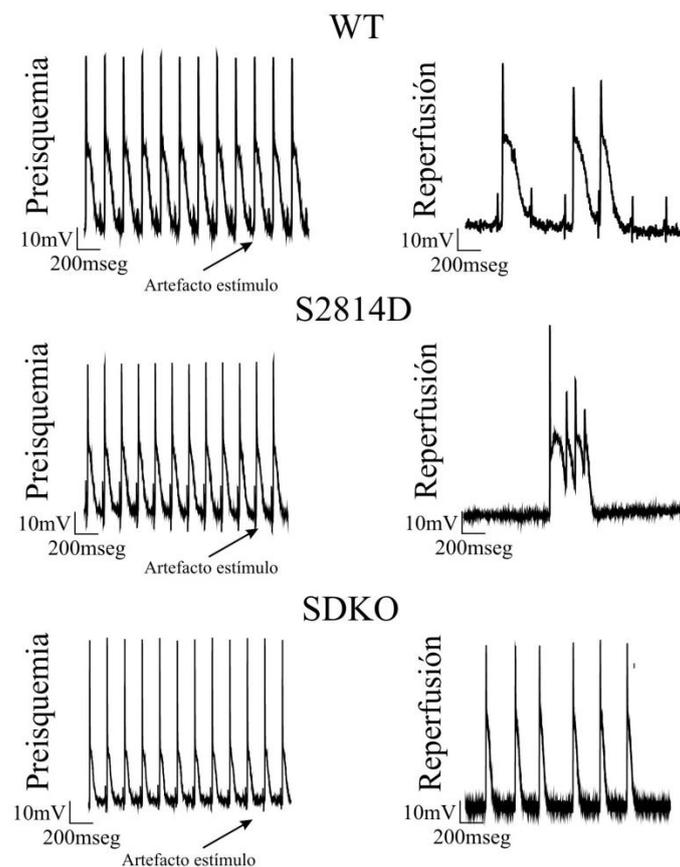


Figura 53. La ablación de la PLN rescata las arritmias de reperfusión en corazones perfundidos. Trazos representativos de potencial de acción previo al período de isquemia y durante la reperfusión en ratones WT, S2814D y SDKO (panel superior, panel medio y panel inferior respectivamente). Las flechas en indican el artefacto introducido por el estímulo eléctrico.

Latidos ventriculares prematuros

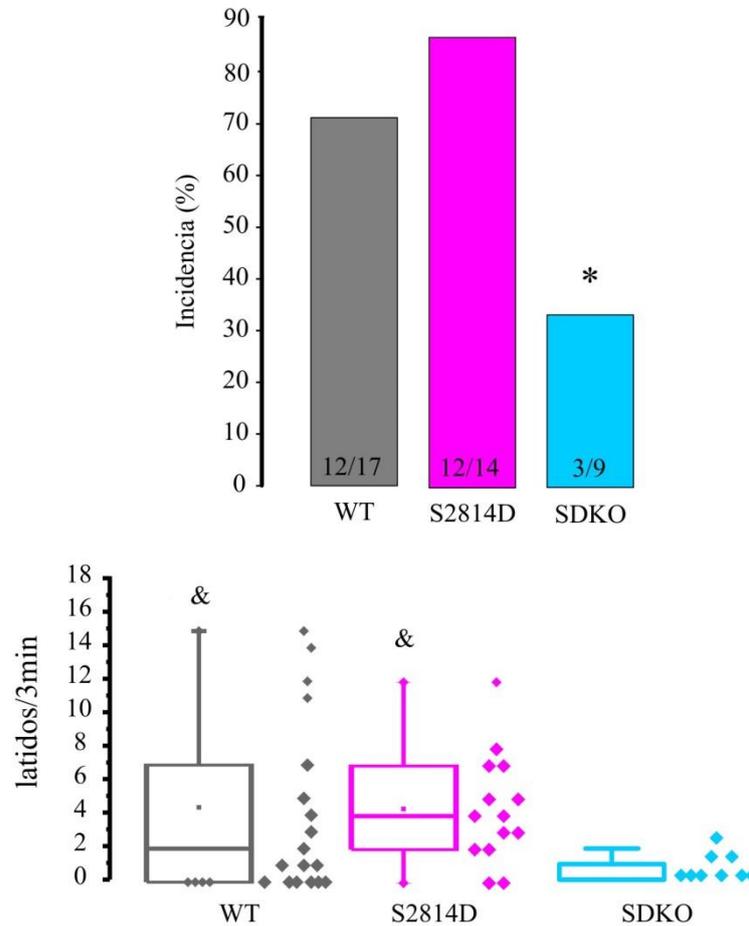


Figura 54 La ablación de la PLN rescata las arritmias de reperfusión en corazones perfundidos. Panel superior, incidencia y Panel inferior, frecuencia (dibujo de caja) de LVP. * $P < 0,05$ vs. S2814D, & $P < 0,05$ vs. SDKO.

El último registro y barra de la Figura 53 y Figura 54 respectivamente muestran que la ablación de PLN protege de las arritmias de reperfusión tanto en corazones WT como S2814D.

En conjunto estos resultados indican que la ablación de la PLN rescata los eventos de arritmias ventriculares *ex vivo* durante la reperfusión luego de un período de isquemia propio de los ratones S2814D y WT.

6. LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA SERCA2a REVIRTIÓ EL EFECTO PROTECTOR DE LA ABLACIÓN DE LA PLN EN LOS RATONES SDKO.

Como una prueba de concepto de los efectos beneficiosos de incrementar la recaptura de Ca^{2+} por el RS sobre las arritmias debido a la pseudofosforilación constitutiva del RyR2 en el sitio Ser^{2814} dependiente de la CaMKII, se realizaron experimentos inhibiendo parcialmente la SERCA2a en corazones de ratones SDKO. Estos corazones se sometieron al mismo protocolo de estrés descrito precedentemente, pero en presencia del inhibidor de la SERCA2a, ácido ciclopiazónico (CPA) $1 \mu\text{M}$. Está descrito que esta concentración de CPA inhibe la actividad de la SERCA2a en aproximadamente un 80% (Schwinger y col. 1997).

La inhibición de la SERCA2a con CPA $1 \mu\text{M}$ aumentó la frecuencia de los latidos ventriculares prematuros en los corazones SDKO reperfundidos en presencia de CPA ($4,25 \pm 1,49$ lat./min SDKO vs $12,00 \pm 4,58$ lat./min SDKO + CPA). La Figura 55 describe un experimento típico en un corazón intacto aislado de SDKO. En la Figura 55A se representan los PA obtenidos en corazones de ratones SDKO latiendo a una concentración de Ca^{2+} extracelular de $6,0 \text{ mM}$, antes y después del CPA. La inhibición parcial de SERCA2a produjo un aumento en la frecuencia de los latidos ventriculares prematuros en los ratones SDKO tal como se muestra en la Figura 55B. En otras palabras, el agregado de CPA y la consiguiente inhibición de la SERCA2a, mimetiza el comportamiento de los corazones S2814D.

Estos resultados confirman farmacológicamente el efecto protector de la ablación genética de PLN sobre los latidos prematuros ventriculares producidos por la reperfusión.

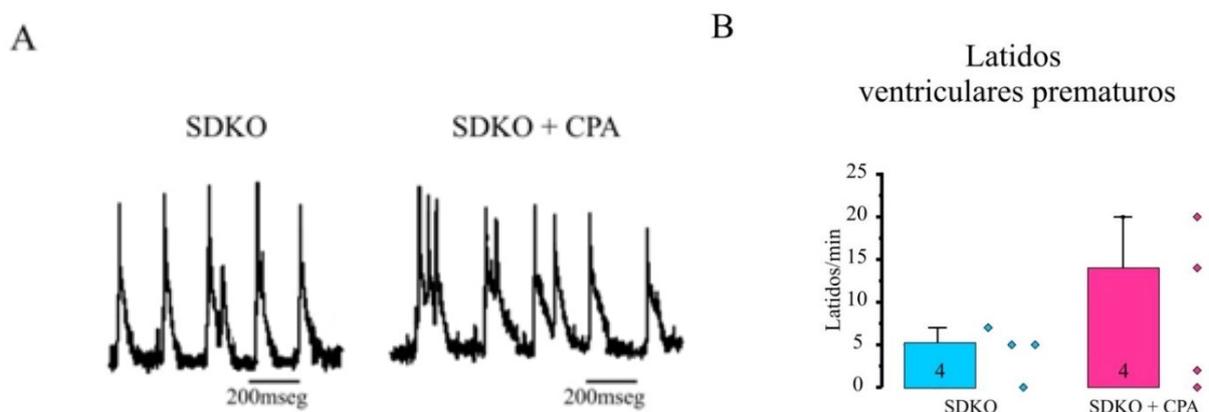


Figura 55. Resultados de los efectos de la inhibición farmacológica de la SERCA2a en los latidos ventriculares prematuros en los ratones SDKO ex vivo. A. Trazos representativos de los potenciales de acción en ausencia y presencia de CPA. B. Resultados de la frecuencia de los latidos prematuros ante la inhibición de la SERCA2a por el agregado de CPA.

7. LA ABLACIÓN DE PLN AUMENTÓ LA PÉRDIDA DE Ca^{2+} MEDIADA POR CHISPAS DE Ca^{2+} DEL RS PERO DISMINUYÓ LA OCURRENCIA DE ONDAS DE Ca^{2+} INDUCIDAS POR I/R EN CORAZONES INTACTOS.

A continuación, se realizaron experimentos para dilucidar los mecanismos subyacentes por los que el aumento de la recaptura de Ca^{2+} del RS por la ablación de la PLN disminuye las arritmias de reperfusión. Experimentos previos revelaron un aumento en la frecuencia de ondas de Ca^{2+} del RS en corazones de ratones WT durante la reperfusión (Mattiuzzi y col., 2015). En este caso se utilizó microscopía confocal para estudiar los eventos espontáneos durante la reperfusión en corazones intactos WT y SDKO. En estos experimentos se nos presentó el inconveniente que no se pudieron hacer estudios en animales S2814D debido a que no pudimos obtener una buena carga del colorante Fluo-4AM en 5 (cinco) ratones en los que se intentó la carga del indicador. Desconocemos la razón de este hecho y hasta donde conocemos, no hay datos en la literatura que lo expliquen. Debido a que las arritmias de reperfusión fueron similares en WT que en S2814D, decidimos estudiar el efecto de la comparar las ondas de Ca^{2+} entre WT y SDKO. La Figura 57 muestra imágenes confocales típicas obtenidas durante la reperfusión de corazones de ratón WT y SDKO sometidos a 15 minutos de isquemia (A y B). Los corazones WT presentaron una pequeña cantidad de ondas de Ca^{2+} en la pre-isquemia la cual aumentó durante la reperfusión, coincidente con datos previos de nuestro laboratorio (Mattiuzzi y col., 2015). Por el contrario, en los corazones de ratones SDKO se observó una menor cantidad de ondas de Ca^{2+} detectables con propagación a lo largo de la célula completa, tanto en la pre-isquemia como durante la reperfusión. En contraste, se evidenciaron tanto ondas de Ca^{2+} incompletas (mini-ondas) así como ondas de Ca^{2+} fragmentadas en una serie de mini-eventos, como un collar de perlas que finalmente se evanescieron. Por sus características macroscópicas intermedias entre las *waves* (ondas) y las *sparks* (chispas) de Ca^{2+} , a estos eventos fragmentados los llamamos, Ca^{2+} *warks*. En la Figura 56 se muestra un registro con microscopía confocal donde se muestra con flechas a las Ca^{2+} *warks*. La Figura 57D muestra los resultados totales de los experimentos. Si bien la pérdida de Ca^{2+} del RS fue más notoria en los corazones de ratones SDKO que en los WT, paradójicamente la frecuencia de ondas de Ca^{2+} fue menor en estos corazones respecto a los WT. En contraste, en los corazones SDKO prevalecieron las ondas fragmentadas o mini-ondas tanto en la pre-isquemia como en la reperfusión. En conjunto, los resultados sugieren que el aumento de la recaptura de Ca^{2+} del RS, a pesar de producir eventos espontáneos de liberación de Ca^{2+} de manera persistente, es capaz de evitar la propagación de la onda Ca^{2+} transformándola en Ca^{2+} *warks* y mini-ondas.

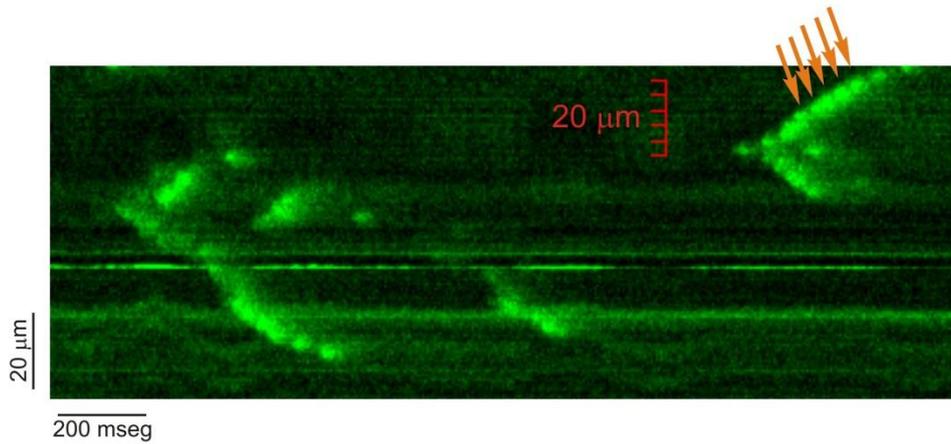
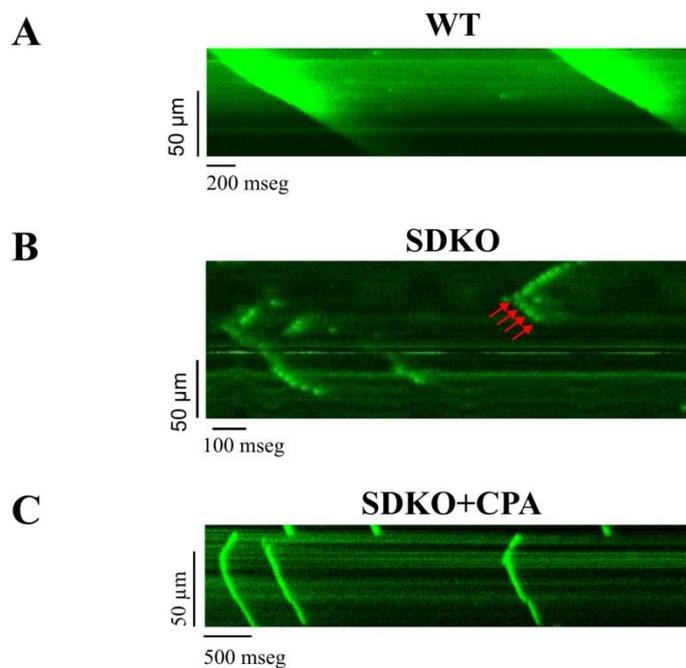


Figura 56. Registro confocal típico obtenido durante la reperfusion de corazones SDKO. Con flechas se marca los eventos fragmentados denominados Ca^{2+} warks

Como una prueba de un concepto, nuevamente se trató a un grupo de corazones de SDKO con el CPA, durante la reperfusion. La Figura 57C muestra resultados típicos de uno de estos experimentos. Después de la administración del CPA, las mini-ondas de Ca^{2+} cambiaron a ondas continuas de Ca^{2+} , lo que concuerda con la idea de que el aumento de la recaptura de Ca^{2+} del RS previene el desarrollo de ondas SR Ca^{2+} arritmogénicas. Se obtuvieron resultados similares en otros dos experimentos diferentes



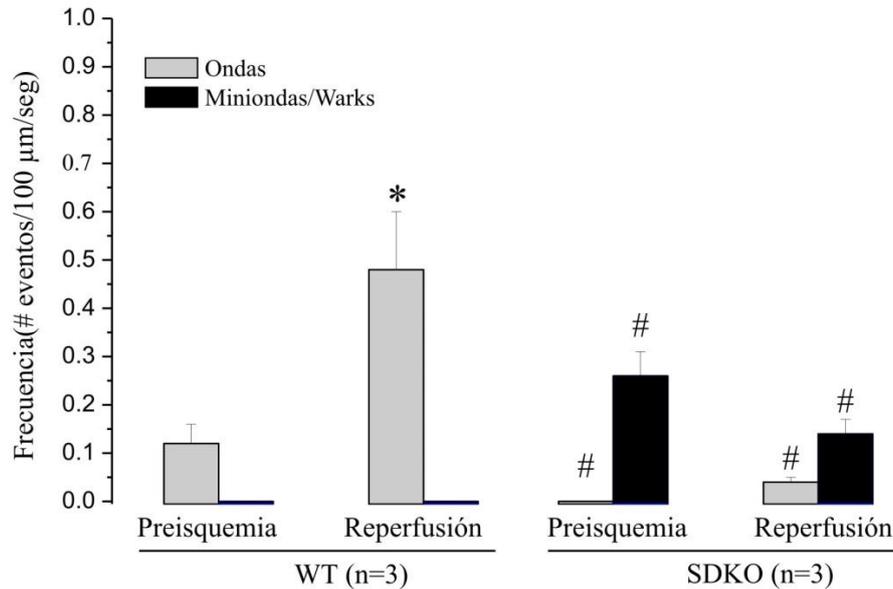
D

Figura 57. Resultados del estudio de ondas de Ca^{2+} con microscopía confocal. Los ratones WT desarrollaron ondas de Ca^{2+} durante la pre-isquemia, cuya frecuencia de aparición se vio aumentada durante la reperusión. Los ratones SDKO, al contrario de los WT, desarrollaron eventos de Ca^{2+} no propagables como mini ondas y warks de Ca^{2+} . A-C. Registros confocales típicos obtenidos durante la reperusión de corazones WT, SDKO y en presencia del inhibidor de la SERCA2a, CPA. D. Valores promedios de la frecuencia de ondas, mini ondas y warks de Ca^{2+} en ratones WT y SDKO. Las warks de Ca^{2+} se transformaron en ondas propagables de Ca^{2+} al inhibir la recaptura de Ca^{2+} de la bomba del RS. * $P < 0.05$ vs .al valor correspondiente de preischemia de los ratones WT, # $P < 0.05$ vs.WT.

DISCUSIÓN

La alteración del patrón de activación normal de los latidos cardíacos se denomina *arritmia*. El origen de éstas se puede encontrar mayoritariamente en *el nodo sinoauricular (debido a cambios en la frecuencia de los impulsos del mismo)*, en *la alteración de la propagación del impulso por modificaciones eléctricas o estructurales o por mecanismos disparados focalmente a nivel celular* tales como las liberaciones anómalas de Ca^{2+} del RS que se propagan en formas de ondas regenerativas de Ca^{2+} a lo largo del miocito (Cowling y col., 2013).

Los resultados expuestos en el presente trabajo demuestran que la ablación de la PLN reduce la propensión a las arritmias ventriculares causadas por la fosforilación del sitio Ser^{2814} en el RyR2 en el corazón intacto, tanto ante un estrés como en la I/R. Los resultados indican que el mecanismo por el que la ablación de la PLN disminuye estas arritmias, es la fragmentación de las ondas de Ca^{2+} propagables y su transformación en eventos no propagables, no arritmogénicos como son las mini ondas y lo que nosotros hemos llamado *warks* de Ca^{2+} , eventos que se asemejan a las cuentas de un collar dispuestas a lo largo de un evento que conserva la forma de onda y termina disipándose. La relevancia clínica de estos hallazgos es obvia con respecto a las arritmias en la IC y las arritmias de reperfusión debido a que la fosforilación de los RyR2 en el sitio Ser^{2814} está aumentada en pacientes y animales con IC (Ai y col., 2005; Sossalla y col., 2010) y durante la reperfusión luego de un periodo de isquemia (Salas y col., 2010; Di Carlo y col., 2014).

1. CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LOS RATONES SDKO.

En el presente trabajo se realizaron en primera instancia experimentos para caracterizar a la nueva cepa doble mutante SDKO. En cuanto a la *caracterización estructural* de los corazones, se observó que histológicamente estos corazones no presentaban diferencias significativas respecto a los WT. Tampoco se detectaron diferencias significativas ni en el *diámetro de los miocitos* ni en la *fibrosis intersticial*. En cuanto a las determinaciones realizadas por ecocardiografía se encontró un aumento en el *diámetro de fin de diástole*, del *espesor sistólico de la pared del septum ventricular* y del *espesor de la pared posterior del VI* versus los ratones WT a los 6 meses de edad. Estos resultados son consistentes con resultados obtenidos en una de las cepas que dio origen a la cepa SDKO, la S2814D, en la que se describió un incremento en estos mismos parámetros respecto a ratones WT, a los 12 meses de edad (Van Oort y col., 2010).

En cuanto a la *caracterización mecánica*, se comprobó que los corazones de los ratones SDKO combinaban las características de sus progenitores. Como se muestra en el capítulo de *Resultados* la ablación de PLN le confirió a la cepa SDKO un $t_{1/2}$ significativamente menor, en comparación a los

ratones WT y S2814D tal como se ha descrito para los ratones PLNKO (Luo y col., 1994). En tanto, dP/dt máx, fue similar a los corazones PLNKO, a pesar del menor contenido de Ca^{2+} del RS, debido a que la fosforilación del RyR2 en Ser²⁸¹⁴, no sólo determina pérdida de Ca^{2+} en diástole sino mayor liberación de Ca^{2+} en sístole (Van Oort y col., 2010., Mazzocchi y col., 2016, Lascano y col., 2017). Similarmente, la caracterización de la *dinámica de Ca^{2+}* mostró que los corazones de ratones SDKO poseen una relajación del transitorio aumentada en comparación a la cepa WT y S2814D y similar a la PLNKO, debido a la ablación de PLN (Lu y col., 1994).

Por otra parte, se encontró que las cepas PLNKO y SDKO presentaron una disminución del tiempo de restitución de la liberación de Ca^{2+} (RLC) un comportamiento típicamente descrito para el aumento de velocidad del secuestro de Ca^{2+} por el RS (Huser y col., 1998, Szentesi y col., 2004).

Respecto a los PA, no se encontraron diferencias morfológicas entre los corazones de ratones WT y los SDKO.

2. LA ABLACIÓN DE LA PLN REDUJO LAS ARRITMIAS VENTRICULARES PROMOVIDAS POR LA FOSFORILACIÓN DE LA CaMKII DEL SITIO Ser²⁸¹⁴ DE LOS RyR2 BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS Y EN I/R.

2.1. ROL DEL INCREMENTO DE LA PÉRDIDA DE Ca^{2+} DEL RS POR FOSFORILACIÓN DEPENDIENTE DE CaMKII EN LAS ARRITMIAS DISPARADAS POR Ca^{2+}

En el presente trabajo se observó además, tanto en los experimentos *in vivo* como *ex vivo* en el corazón intacto, que la fosforilación del RyR2 en Ser²⁸¹⁴, produjo aumento de las ondas arritmogénicas de Ca^{2+} y de las arritmias ventriculares en respuesta a un estrés. Estos resultados concuerdan con experimentos previos en ratones S2814D que revelaron el rol central que juega la fosforilación por CaMKII de los RyR2 en los eventos arritmogénicos inducidos por estrés a nivel de animal entero así como también en el incremento de la pérdida de Ca^{2+} del RS a nivel del miocito (van Oort y col., 2010). En un trabajo previo del grupo al que pertenezco se mostró a nivel celular que los ratones S2814D incrementaron no sólo la frecuencia de las chispas o destellos de Ca^{2+} sino las ondas de Ca^{2+} arritmogénicas del RS brindando un nexo mecanístico entre la fosforilación dependiente de CaMKII del RyR2 y las arritmias ventriculares en los ratones S2814D (Mazzocchi y col., 2016).

Estos resultados se observaron en ratones S2814D tanto homocigotas como heterocigotas. Esto adquiere importancia frente al hecho que los ratones SDKO homocigotas representan una situación particular en donde los RyR2 se encuentran máximamente y permanentemente pseudofosforilados por la CaMKII en el residuo 2814. Es quizás poco probable que ésta sea la situación de las enfermedades

en las cuales la CaMKII aumenta su actividad, como en la injuria por I/R o en la IC. Resultados previos indican que los RyR2 son fosforilados por la CaMKII sólo en los primeros minutos de la reperfusión luego de la isquemia (Salas y col. 2010; Di Carlo y col. 2014). Se ha descrito también que en animales o pacientes con IC, el nivel de fosforilación del sitio Ser²⁸¹⁴ aumenta en un 50-100% (Ai y col. 2005; Chelu y col. 2009; Sossalla y col. 2010). Otros trabajos también describieron que los ratones heterocigotas para la mutación S2814D tienen un patrón arritmico similar a los ratones homocigotas (van Oort y col. 2010).

Por otra parte, se observó que los corazones de animales WT tenían un incremento en la frecuencia de ondas de Ca²⁺ al comienzo de la reperfusión respecto a isquemia, en coincidencia con el aumento de fosforilación del residuo Ser²⁸¹⁴ del RyR2, descrito previamente (Salas y col., 2010; Di Carlo y col., 2014), proveyendo nuevamente el sustrato mecanístico de las arritmias en este caso de reperfusión. El incremento en las ondas de Ca²⁺ del RS conduciría a una extrusión de Ca²⁺ aumentada a través del NCX electrogénico. Este transporte electrogénico genera una corriente despolarizante (I_{ti} o corriente de entrada transitoria), la cual, cuando es lo suficientemente grande produce DADs y en caso eventual de alcanzar el umbral puede ser capaz de disparar PAs ectópicos y consecuentemente arritmias ventriculares (Fujiwara y col., 2008).

2.2. ROL DE LA AUMENTO EN LA RECAPTURA DE Ca²⁺ DEL RS POR ABLACIÓN DE LA PLN EN LAS ARRITMIAS DISPARADAS POR Ca²⁺

En tanto que el rol crucial del incremento en la actividad del RyR2 en el desarrollo de arritmias disparadas por Ca²⁺ es bastante evidente, el rol del incremento en la recaptura de Ca²⁺ del RS ha permanecido incierto y existe evidencia que describe tanto efectos beneficiosos así como perjudiciales de diferentes maniobras utilizadas para aumentar la recaptura de Ca²⁺ del RS (del Monte y col., 2004; Prunier y col., 2008; Liu y col., 2015; Lukyanenko y col.; 1999; Landgraf y col., 2004; Stokke y col., 2010). Como se describió en la Introducción, la discrepancias de estos resultados podría deberse al menos en parte a las características y consecuencias inherentes al aumento en la recaptura de Ca²⁺ en sí misma: el aumento del secuestro de Ca²⁺ disminuye el Ca²⁺ citosólico, pero por otro lado, aumenta el Ca²⁺ del RS y favorece de este modo su pérdida, aumentando así el Ca²⁺ citosólico. Un pequeño desbalance entre liberación y recaptura, podría explicar parte de estas diferencias.

Nuestros experimentos indican que el incremento de la recaptura de Ca²⁺ del RS en la magnitud que lo hace la ablación de PLN, disminuye la propensión a arritmias favorecidas por la fosforilación del RyR2 en el sitio Ser²⁸¹⁴. Los estudios de microscopia confocal nos permitieron dilucidar el mecanismo de este efecto: el aumento del secuestro de Ca²⁺ incrementó dramáticamente las chispas de Ca²⁺ y la pérdida de Ca²⁺ del RS. A pesar de este incremento, las ondas de Ca²⁺ disminuyeron significativamente.

Un incremento en la pérdida de Ca^{2+} del RS asociado con una disminución en las ondas de Ca^{2+} indica una limitación en la propagación de las ondas. Efectivamente, estas aparecen fragmentadas, convertidas en eventos no propagables. Es posible que el aumento del secuestro de Ca^{2+} , al disminuir el Ca^{2+} citosólico, aumente su capacidad amortiguadora para el ion, dejando sitios amortiguadores libres a los que se uniría el Ca^{2+} de la onda, con lo que la misma resultaría fragmentada. Esta posibilidad está siendo estudiada actualmente en el laboratorio.

Por otra parte, se describió que los ratones PLNKO tienen una menor expresión de RyR2 respecto a los WT (aproximadamente un 25% , Chu y col. 1998). En experimentos todavía no publicados (Valverde y colaboradores, 2017, enviado a publicar), hemos descrito una reducción similar de la expresión de los RyR2 en corazones de ratones SDKO. Estos resultados podrían indicar que la disminución en los eventos arritmogénicos observados en los ratones SDKO podría ser al menos parcialmente explicada por esta reducción en los canales de Ca^{2+} del RS. Sin embargo, hemos demostrado previamente que la frecuencia de las chispas de Ca^{2+} , la amplitud de las mismas y la pérdida de Ca^{2+} del RS son más altas en los miocitos PLNKO y SDKO en comparación con los miocitos WT y S2814D (Mazzocchi y col., 2016). Idénticos resultados se obtuvieron en el corazón intacto en el presente trabajo. Estos resultados hacen poco probable que la disminución de las arritmias observada en los ratones SDKO sea atribuible a la disminución en la abundancia de los RyR2.

3. LA INHIBICIÓN DE LA SERCA2a REVIRTIÓ EL EFECTO PROTECTOR DE LA ABLACIÓN DE LA PLN EN LOS RATONES SDKO.

Los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral utilizando el inhibidor de la SERCA2a, CPA, demostraron la transformación del patrón de PAs no arritmogénicos de los SDKO a patrones similares a los de los S2814D. En los experimentos realizados en microscopía confocal en corazón intacto también arrojaron resultados similares: la administración de CPA transformó las mini ondas y warks no arritmogénicas en ondas completas, mimetizando el fenotipo arritmogénico de los corazones S2814D. Esta es una prueba de concepto que indica que la disminución del secuestro de Ca^{2+} reconvierte las mini ondas de Ca^{2+} en ondas, mimetizando el comportamiento de los corazones S2814D. En nuestro laboratorio se obtuvieron previamente resultados similares en miocitos aislados (Mazzocchi y col., 2016).

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que

1. Los corazones de animales SDKO combinan las características propias del incremento en la recaptura de Ca^{2+} por la ablación de PLN típica de los ratones PLNKO y del aumento de la pérdida de Ca^{2+} del RS típica de los ratones S2814D.
2. El aumento de la recaptura de Ca^{2+} por el RS por ablación de PLN previno las arritmias generadas en condiciones de estrés (alta frecuencia cardíaca y alta concentración de Ca^{2+} extracelular), típicas de la fosforilación del sitio Ser²⁸¹⁴ de RyR2.
3. El aumento de la recaptura de Ca^{2+} por el RS por ablación de PLN fue capaz de atenuar las arritmias por I/R, mediadas en parte por la fosforilación dependiente de CaMKII del RyR2 en el sitio Ser²⁸¹⁴.
4. El aumento de la recaptura de Ca^{2+} por el RS por ablación de PLN transformó las ondas arritmogénicas de la reperfusión en eventos no propagables, no arritmogénicos, en tanto que la inhibición de SERCA2a, permitió recuperar el fenotipo arritmogénico de los corazones S2814D.

BIBLIOGRAFÍA

- Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M., & Pogwizd, S. M. (2005). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circulation Research*, *97*, 1314–1322.
- Bai, Y., Jones, P. P., Guo, J., Zhong, X., Clark, R. B., Zhou, Q., Chen, S. R. W. (2013). Phospholamban knockout breaks arrhythmogenic Ca^{2+} waves and suppresses catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice. *Circulation Research*, *113*, 517–526.
- Becerra, R., Román, B., Di Carlo, M. N., Mariangelo, J. I., Salas, M., Sanchez, G., Said, M. (2016). Reversible redox modifications of ryanodine receptor ameliorate ventricular arrhythmias in the ischemic-reperfused heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *311*, H713–H724.
- Benjamin, E., Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de F. S., Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jimenez MC, Jordan LC, J. S., Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, M. R., Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, P. L., Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, R. G., Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, M. P. (2017). *Heart Disease and Stroke Statistics*.
- Bers, D. M. (2001). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* (Second). Baltimore, Maryland: *Kluwer Academic Press*.
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, *415*, 198–205.
- Bers, D. M. (2004). Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *37*, 417–429.
- Bers, D. M. (2008). Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes.
- Bers, D. M., & Guo, T. (2005). Calcium Signaling in Cardiac Ventricular Myocytes. *Annals*

of the New York Academy of Sciences, 1047, 86–98.

Blaustein, M., Kao, J., & Matteson, D. (2012). *Cellular Physiology and Neurophysiology*. Mosby, Elsevier.

Brien, F. O., Venturi, E., & Sitsapesan, R. (2015). The ryanodine receptor provides high throughput Ca^{2+} -release but is precisely regulated by networks of associated proteins : a focus on proteins relevant to phosphorylation, *43*, 426–433.

Carafoli, E., & Stauffer, T. (1994). The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *Journal of Neurobiology, 25*, 312–324.

Chelu, M. G., Sarma, S., Sood, S., Wang, S., Van Oort, R. J., Skapura, D. G., Wehrens, X. H. T. (2009). Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak promotes atrial fibrillation in mice. *Journal of Clinical Investigation, 119*, 1940–1951.

Cheng, H., Lederer, W. J., & Cannell, M. B. (1993). Calcium Sparks : Elementary Events Underlying Excitation-Contraction Coupling in Heart Muscle Author (s): H . Cheng , W . J . Lederer , M . B . Cannell Published by: *American Association for the Advancement of Science Stable*.

Chu, G., Ferguson, D. G., Edes, I., Kiss, E., Sato, Y., & Kranias, E. G. (1998). Phospholamban Ablation and Compensatory Responses in the Mammalian Heart a. *Annals of the New York Academy of Sciences, 853*, 49–62.

Cingolani, H. E., & Houssay, A. B. (2002). *Fisiología Humana de Houssay (Séptima)*. Buenos Aires, Argentina. *Editorial el Ateneo*.

Cleland, J. G., Chattopadhyay, S., Khand, A., Houghton, T., & Kaye, G. C. (2002). Prevalence and incidence of arrhythmias and sudden death in heart failure. *Heart Fail.Rev, 7*, 229–242.

Contreras, P., Migliaro, E. R., & Suhr, B. (2014). Right atrium cholinergic deficit in septic rats. *Autonomic Neuroscience, 180*, 17–23.

- Cowling, B. J., Freeman, G., Wong, J. Y., Wu, P., Liao, Q., Lau, E. H., Leung, G. M. (2013). Preliminary inferences on the age-specific seriousness of human disease caused by avian influenza A(H7N9) infections in China, March to April 2013. *Euro Surveillance: Bulletin Europaen Sur Les Maladies Transmissibles. European Communicable Disease Bulletin*, 18, 20475.
- Davia, K., Bernobich, E., Ranu, H. K., del Monte, F., Terracciano, C. M., MacLeod, K. T., Harding, S. E. (2001). SERCA2A overexpression decreases the incidence of aftercontractions in adult rabbit ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33, 1005–15.
- del Monte, F., Lebeche, D., Guerrero, J. L., Tsuji, T., Doye, A. A., Gwathmey, J. K., & Hajjar, R. J. (2004). Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 5622–5627.
- Di Carlo, M. N., Said, M., Ling, H., Valverde, C. A., De Giusti, V. C., Sommesse, L., Mattiazzi, A. (2014). CaMKII-dependent phosphorylation of cardiac ryanodine receptors regulates cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 74, 274–283.
- Drago, G. A., & Colyer, J. (1994). Discrimination between two sites of phosphorylation on adjacent amino acids by phosphorylation site-specific antibodies to phospholamban. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 25073–25077.
- Erickson, J. R., Joiner, M. ling A., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C. V., Anderson, M. E. (2008). A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell*, 133, 462–474.
- Fabiato A, & Fabiato, F. (1975). Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *The Journal of Physiology*, 249, 469–495.
- Fawcett, D., & McNutt, N (1969). The Ultrastructure Of The Cat Myocardium I. *Ventricular*

Papillary Muscle.

- Ferrero, P., Said, M., Sánchez, G., Vittone, L., Valverde, C., Donoso, P., Mundiña-Weilenmann, C. (2007). *NIH Public Access*, 43, 281–291.
- Fox, S. I. (2013). *Human Physiology. Journal of Chemical Information and Modeling* (Twelfth, Vol. 53). New York. USA: Mc Graw Hill.
- Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., & Ramesh, V. (1999). Shape, size, and distribution of Ca^{2+} release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophysical Journal*, 77, 1528–1539.
- Fujiwara, K., Tanaka, H., Mani, H., Nakagami, T., & Takamatsu, T. (2008). Burst emergence of intracellular Ca^{2+} waves evokes arrhythmogenic oscillatory depolarization via the Na^+ - Ca^{2+} exchanger: Simultaneous confocal recording of membrane potential and intracellular Ca^{2+} in the heart. *Circulation Research*, 103, 509–518.
- Ginsburg, K. S., & Bers, D. M. (2005). Isoproterenol does not enhance Ca-dependent Na/Ca exchange current in intact rabbit ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39, 972–981.
- Gonano, L. A., Sepúlveda, M., Rico, Y., Kaetzel, M., Valverde, C. A., Dedman, J., Petroff, M. V. (2011). Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 4, 947–957.
- Gustavsson, M., Verardi, R., Mullen, D. G., Mote, K. R., Traaseth, N. J., Gopinath, T., & Veglia, G. (2013). Allosteric regulation of SERCA by phosphorylation-mediated conformational shift of phospholamban. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 17338–43.
- Györke, I., Hester, N., Jones, L. R., & Györke, S. (2004). The Role of Calsequestrin, Triadin, and Junctin in Conferring Cardiac Ryanodine Receptor Responsiveness to Luminal Calcium, *Biophysical Journal* 86, 2121–2128.
- Hain, J., Onoue, H., Mayrleitner, M., Flesicher, S., & Schindler, H. (1995). Phosphorylation

modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *The Journal of Biological Chemistry*.

Hajjar, R. J., Zsebo, K., Deckelbaum, L., Thompson, C., Rudy, J., Yaroshinsky, A., Jessup, M. (2008). Design of a Phase 1/2 Trial of Intracoronary Administration of AAV1/SERCA2a in Patients With Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure*, 14, 355–367.

Hasenfuss, G., & Pieske, B. (2002). Calcium Cycling in Congestive Heart Failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34, 951–969.

Herzog, W., Powers, K., Johnston, K., & Duvall, M. (2015). A new paradigm for muscle contraction, 6, 1–11.

Hudmon, A., & Schulman, H. (2002). Structure-function of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *The Biochemical Journal*, 364, 593–611.

Huser, J., Bers, D. M., & Blatter, L. A. (1998a). Subcellular properties of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in phospholamban-deficient mouse ventricular cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 274, H1800-1811.

Huser, J., Bers, D. M., & Blatter, L. A. (1998b). Subcellular properties of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in phospholamban-deficient mouse ventricular cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 274, H1800-1811.

Kawakami, M., & Okabe, E. (1998). Superoxide anion radical-triggered Ca^{2+} release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca^{2+} channel. *Molecular Pharmacology*, 53, 497–503.

Knollmann, B. C., Chopra, N., Hlaing, T., Akin, B., Yang, T., Etensohn, K., Pfeifer, K. (2006). Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca^{2+} release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 2510–2520.

Köhler, A. C., Sag, C. M., & Maier, L. S. (2014). Reactive oxygen species and excitation-

- contraction coupling in the context of cardiac pathology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73, 92–102.
- Kornyeyev, D., Petrosky, A. D., Zepeda, B., Ferreiro, M., Knollmann, B., & Escobar, A. L. (2012). Calsequestrin 2 deletion shortens the refractoriness of Ca²⁺ release and reduces rate-dependent Ca²⁺-alternans in intact mouse hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52, 21–31.
- Kranias, E. G. (1985). Regulation of Calcium Transport by Protein Phosphatase Activity Associated with Cardiac Sarcoplasmic Reticulum, 260, 11006–11010.
- Kuschel, M., Karczewski, P., Hempel, P., Schlegel, W. P., Krause, E. G., & Bartel, S. (1999). Ser16 prevails over Thr17 phospholamban phosphorylation in the beta-adrenergic regulation of cardiac relaxation. *The American Journal of Physiology*, 276, H1625-33.
- Landgraf, G., Gellerich, F. N., & Wussling, M. H. P. (2004). Inhibitors of SERCA and mitochondrial Ca-uniporter decrease velocity of calcium waves in rat cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 256–257, 379–386.
- Lang, R. M., Badano, L. P., Mor-Avi, V., Afilalo, J., Armstrong, A., Ernande, L., Voigt, J.-U. (2015). *Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. *Journal of the American Society of Echocardiography* (Vol. 28).
- Lascano, E. C., Negroni, J. A., Vila-Petroff, M. G., & Mattiazzi, A. (2017). The impact of RyR2 potentiation on myocardial function. *Heart and Circulatory Physiology*.
- Laurita, K. ., & Rosenbaum, D. (2008). Mechanisms and potential therapeutic targets for ventricular arrhythmias associated with impaired cardiac calcium cycling, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* .48, 1–6.
- Leberer, E., Charuk, J. H., Green, N. M., & MacLennan, D. H. (1989). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a luminal calcium binding glycoprotein from

sarcoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6047–51.

Levi, A. J., Spitzer, K. W., Kohmoto, O., & Bridge, J. H. (1994). Depolarization-induced Ca entry via Na-Ca exchange triggers SR release in guinea pig cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 266, H1422-1433.

Li, L., Desantiago, J., Chu, G., Kranias, E. G., & Bers, D. M. (2000). Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 278, H769–H779.

Li, Y., Kranias, E. G., Mignery, G., & Bers, D. M. (2002). Protein Kinase A Phosphorylation of the Ryanodine Receptor Does Not Affect Calcium Sparks in Mouse Ventricular Myocytes. *Circulation Research*, 90, 309–316.

Lipp, P., Laine, M., Tovey, S. C., Burrell, K. M., Berridge, M. J., Li, W., & Bootman, M. D. (2000). Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Current Biology*, 10, 939–942.

Litwin, S. E., Li, J., & Bridge, J. H. B. (1998). Na-Ca Exchange and the Trigger for Sarcoplasmic Reticulum Ca Release: Studies in Adult Rabbit Ventricular Myocytes. *Biophysical Journal*, 75, 359–371.

Liu, B., Ho, H. T., Brunello, L., Unudurthi, S. D., Lou, Q., Belevych, A. E., Györke, S. (2015). Ablation of HRC alleviates cardiac arrhythmia and improves abnormal Ca handling in CASQ2 knockout mice prone to CPVT. *Cardiovascular Research*, 108, 299–311.

Liu, G. S., Morales, A., Vafiadaki, E., Lam, C. K., Cai, W. F., Haghighi, K., Kranias, E. G. (2015). A novel human R25C-phospholamban mutation is associated with super-inhibition of calcium cycling and ventricular arrhythmia. *Cardiovascular Research*, 107, 164–174.

- Liu, N., & Priori, S. G. (2008). Disruption of calcium homeostasis and arrhythmogenesis induced by mutations in the cardiac ryanodine receptor and calsequestrin. *Cardiovascular Research*, 77, 293–301.
- Liu, O. Z., Lederer, W. J., & Sobie, E. A. (2012). Does the Goldilocks Principle apply to calcium release restitution in heart cells? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52, 3–6.
- Lokuta, A. J., Rogers, T. B., Lederer, W. J., & Valdivia, H. H. (1995). Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *The Journal of Physiology*, 487 (Pt 3), 609–22.
- Lukyanenko, V., Subramanian, S., Gy, I., Wiesner, T. F., & Gy, S. (1999). The role of luminal Ca in the generation of Ca waves in rat ventricular myocytes. *Image Processing*, 173–186.
- Luo, M., & Anderson, M. E. (2013). Mechanisms of altered Ca²⁺ handling in heart failure. *Circulation Research*, 113, 690–708.
- Luo, W., Grupp, I. L., Harrer, J., Ponniah, S., Grupp, G., Duffy, J. J., Kranias, E. G. (1994). Targeted Ablation of the Phospholamban Gene Is Associated With Markedly Enhanced Myocardial Contractility and Loss of β -Agonist Stimulation. *American Heart Association*, 25–27.
- MacDougall, L. K., Jones, L. R., & Cohen, P. (1991). Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 196, 725–34.
- Maier, L. S., & Bers, D. M. (2002). Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34, 919–939.
- Marshall, C. R., Fox, J. a, Butland, S. L., Ouellette, B. F. F., Brinkman, F. S. L., & Tibbits, G. F. (2005). Phylogeny of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) genes from genomic data identifies

- new gene duplications and a new family member in fish species. *Physiological Genomics*, *21*, 161–73.
- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Roseblit, N., & Marks, a R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, *101*, 365–376.
- Mattiazzi, A., Argenziano, M., Aguilar-Sanchez, Y., Mazzocchi, G., & Escobar, A. L. (2015). Ca^{2+} Sparks and Ca^{2+} waves are the subcellular events underlying Ca^{2+} overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *79*.
- Mattiazzi, A., & Kranias, E. G. (2014). The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease, *5*, 1–11.
- Mazzocchi, G., Sommese, L., Palomeque, J., Felice, J., Di Carlo, M., Fainstein, D., Mattiazzi, A. (2016). Phospholamban ablation rescues the enhanced propensity to arrhythmias of mice with CaMKII-constitutive phosphorylation of RyR2-S2814 site. *The Journal of Physiology*.
- Mejía-Alvarez, R., Manno, C., Villalba-Galea, C. a, del Valle Fernández, L., Costa, R. R., Fill, M., Escobar, A. L. (2003). Pulsed local-field fluorescence microscopy: a new approach for measuring cellular signals in the beating heart. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, *445*, 747–758.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., & Niiyama, T. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*, *340*, 230–233.
- Mozaffarian, D., Anker, S. D., Anand, I., Linker, D. T., Sullivan, M. D., Cleland, J. G. F., ... Levy, W. C. (2007). Prediction of mode of death in heart failure: The Seattle Heart Failure Model. *Circulation*, *116*, 392–398.

- Mundiña-Weilenmann, C., Vittone, L., Ortale, M., De Cingolani, G. C., & Mattiazzi, A. (1996). Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart. *Journal of Biological Chemistry*, *271*, 33561–33567.
- Palomeque, J., Rueda, O. V., Sapia, L., Valverde, C. A., Salas, M., Petroff, M. V., & Mattiazzi, A. (2009). Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca²⁺ dependence of Ca²⁺-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. *Circulation Research*, *105*, 1204–1212.
- Perez, P. J., Ramos-Franco, J., Fill, M., & Mignery, G. a. (1997). Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*, 23961–23969.
- Poggioli, J., Sulpice, J. C., & Vassort, G. (1986). Inositol phosphate production following alpha1-adrenergic, muscarinic or electrical stimulation in isolated rat heart. *Febs Letter*, *206*, 292–298.
- Pogwizd, S. M., & Bers, D. M. (2004). Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *14*, 61–66.
- Prunier, F., Kawase, Y., Gianni, D., Scapin, C., Danik, S. B., Ellinor, P. T., ... Del Monte, F. (2008). Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump overexpression in a porcine model of ischemia reperfusion. *Circulation*, *118*, 614–624.
- Radwański, P. B., Belevych, A. E., Brunello, L., Carnes, C. A., & Györke, S. (2013). Store-dependent deactivation: Cooling the chain-reaction of myocardial calcium signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *58*, 77–83.
- Ramay, H. R., Liu, O. Z., & Sobie, E. A. (2011). Recovery of cardiac calcium release is controlled by sarcoplasmic reticulum refilling and ryanodine receptor sensitivity. *Cardiovascular Research*, *91*, 598–605.

- Reddy, L. G., Jones, L. R., Pace, R. C., & Stokes, D. L. (1996). Purified , Reconstituted Cardiac Ca^{2+} -ATPase Is Regulated by Phospholamban but Not by Direct Phosphorylation with Ca^{2+} / Calmodulin-dependent Protein Kinase , *J Biol Chem* 271, 14964–14970.
- Rodriguez, P., Bhogal, M. S., & Colyer, J. (2003). Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 38593–38600.
- Said, M., Becerra, R., Palomeque, J., Rinaldi, G., Kaetzel, M., Diaz-Sylvester, P. L., Mattiazzi, a. (2008). 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. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 295, H1669–H1683.
- Said, M., Becerra, R., Valverde, C. A., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., Mundiña-Weilenmann, C., Mattiazzi, A. (2011). Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): A main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51, 936–944.
- Salas, M. A., Valverde, C. A., Sánchez, G., Said, M., Rodriguez, J. S., Portiansky, E. L., ... Mattiazzi, A. (2010). The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48, 1298–1306.
- Salas, M. a, Vila-Petroff, M. G., Palomeque, J., Aiello, E. a, & Mattiazzi, a. (2001). Positive inotropic and negative lusitropic effect of angiotensin II: intracellular mechanisms and second messengers. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33, 1957–71.
- Schulman, H., Hanson, P. I., & Meyer, T. (1992). Decoding calcium signals by multifunctional CaM kinase. *Cell Calcium*, 13, 401–411.
- Scott, B. T., Simmerman, H. K., Collins, J. H., Nadal-Ginard, B., & Jones, L. R. (1988). Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA

- cloning. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 8958–8964.
- Sharma, M. R., Jeyakumar Loice H., Fleischer, S., & Wagenknecht, T. (2000). Three-dimensional Structure of Ryanodine Receptor Isoform Three in Two Conformational States as Visualized by Cryo-electron Microscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 9485–9491.
- Shoshan-Barmatz, V., Orr, I., Weil, S., Meyer, H., Varsanyi, M., & Heilmeyer, L. (1996). The identification of the phosphorylated 150/160-kDa proteins of sarcoplasmic reticulum, their kinase and their association with the ryanodine receptor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 4439, 89–100.
- Simmerman, H. K., & Jones, L. R. (1998). Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev.*, 78, 921–947.
- Singh, V. P., Rubinstein, J., Arvanitis, D. A., Ren, X., Gao, X., Haghghi, K., Kranias, E. G. (2013). Abnormal Calcium Cycling and Cardiac Arrhythmias Associated With the Human Ser96Ala Genetic Variant of Histidine-Rich Calcium-Binding Protein. *Journal of the American Heart Association*, 2, e000460.
- Sipido, K. R., Carmeliet, E., & Van deWerb, F. (1998). T-type Ca current as trigger for Ca release from the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 508, 439–451.
- Sivakumaran, V., Stanley, B. A., Tocchetti, C. G., Ballin, J. D., Caceres, V., Zhou, L., Paolocci, N. (2013). HNO enhances SERCA2a activity and cardiomyocyte function by promoting redox-dependent phospholamban oligomerization. *Antioxid Redox Signal*, 19, 1185–1197.
- Sossalla, S., Fluschnik, N., Schotola, H., Ort, K. R., Neef, S., Schulte, T., Maier, L. S. (2010). Inhibition of elevated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circulation Research*, 107, 1150–1161.
- Stokke, M. K., Hougen, K., Sjaastad, I., Louch, W. E., Briston, S. J., Enger, U. H., Trafford,

- A. W. (2010). Reduced SERCA2 abundance decreases the propensity for Ca²⁺ wave development in ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, *86*, 63–71.
- Szentesi, P., Pignier, C., Egger, M., Kranias, E. G., & Niggli, E. (2004). Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Refilling Controls Recovery From Ca²⁺ -Induced Ca²⁺ Release Refractoriness in Heart Muscle. *Circulation Research*.
- Tada, M., Inui, M., Yamada, M., Kadoma, M. aki, Kuzuya, T., Abe, H., & Kakiuchi, S. (1983). Effects of phospholamban phosphorylation catalyzed by adenosine monophosphate- and calmodulin-dependent protein kinases on calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *15*, 335–346.
- Tada, M., Kirchberger, M. A., & Katz, A. M. (1974). The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *249*, 6174–6180.
- Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Gyorke, I., Terentyeva, R., & Györke, S. (2003). Protein phosphatases decrease sarcoplasmic reticulum calcium content by stimulating calcium release in cardiac myocytes. *The Journal of Physiology*, *552*, 109–118.
- Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Valdivia, H. H., Escobar, A. L., & Györke, S. (2002). Luminal Ca²⁺ controls termination and refractory behavior of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in cardiac myocytes. *Circulation Research*, *91*, 414–420.
- Valdivia, H. H. (2012). Ryanodine receptor phosphorylation and heart failure: Phasing out s2808 and criminalizing S2814. *Circulation Research*, *110*, 1398–1402.
- Valdivia, H. H., Kaplan, J. H., Ellis-Davies, G. C. R., & Lederer, W. J. (1995). Rapid Adaptation of Cardiac Ryanodine Receptors: Modulation by Mg²⁺ and Phosphorylation, *Science*. *100*, 130–134.
- Valverde, C. A., Mundiña-Weilenmann, C., Reyes, M., Kranias, E. G., Escobar, A. L., & Mattiazzi, A. (2006). Phospholamban phosphorylation sites enhance the recovery of

- intracellular Ca^{2+} after perfusion arrest in isolated, perfused mouse heart. *Cardiovascular Research*, 70, 335–345.
- Van Oort, R. J., McCauley, M. D., Dixit, S. S., Pereira, L., Yang, Y., Respress, J. L., Wehrens, X. H. T. (2010). Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *Circulation*, 122, 2669–2679.
- Velandía, M. L., Garavro, Z. V, Caldas, M. L., & Hurtado, H. (2001). ATPasa de calcio en el sistema nervioso. *Biomédica*, 62–69.
- Viatchenko-Karpinski, S., & Györke, S. (2001). Modulation of the Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release cascade by beta-adrenergic stimulation in rat ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*, 533, 837–48.
- Vincent, K. P., McCulloch, A. D., & Edwards, A. G. (2014). Toward a hierarchy of mechanisms in CaMKII-mediated arrhythmia. *Frontiers in Pharmacology*, , 1–11.
- Vittone, L., Mundina, C., Chiappe de Cingolani, G., & Mattiazzi, A. (1990). cAMP and calcium-dependent mechanisms of phospholamban phosphorylation in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 258, H318-325.
- Vittone, L., Mundiña-Weilenmann, C., Said, M., Ferrero, P., & Mattiazzi, A. (2002). Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34, 39–50.
- Wehrens, X., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., & Marks, A. . (2004). Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation Regulates the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circulation Research*, 94, e61–e70.
- Wehrens, & Marks, A. R. (2004). Novel therapeutic approaches for heart failure by normalizing calcium cycling. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3, 565–573.
- Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C., & Jones, L. R. (1991). Unique

- phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem*, 266, 11144–11152.
- Wu, Y., Dzhura, I., Colbran, R. J., & Anderson, M. E. (2001). Calmodulin kinase and a calmodulin-binding “IQ” domain facilitate L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes by a common mechanism. *Journal of Physiology*, 535, 679–687.
- Xiao, R. P., Cheng, H., Lederer, W. J., Suzuki, T., & Lakatta, E. G. (1994). Dual regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9659–63.
- Xu, L., Eu, J., Meissner, G., & Stamler, J. (1998). Activation of the Cardiac Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) by Poly-S-Nitrosylation. *Science*, 279, 234–237.
- Yan, Y., Liu, J., Wei, C., Li, K., Xie, W., Wang, Y., & Cheng, H. (2008). Bidirectional regulation of Ca²⁺ sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*, 77, 432–41.
- Yang, L., Liu, G., Zakharov, S. I., Morrow, J. P., Rybin, V. O., Steinberg, S. F., & Marx, S. O. (2005). Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 207–214.
- Yano, M., Okuda, S., Oda, T., Tokuhisa, T., Tateishi, H., Mochizuki, M., Matsuzaki, M. (2005). Correction of defective interdomain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure. *Circulation*, 112, 3633–43.
- Yuan, W., & Bers, D. M. (1994). Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 267, H982-993.
- Zable, A. C., Favero, T. G., & Abramson, J. J. (1997). Glutathione Modulates Ryanodine Receptor from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum: Evidence for redox regulation of the Ca²⁺ release mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 7069–7077.
- Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y. M., Jones, L. R., & Chem, J. B. (1997).

Complex Formation between Junctin , Triadin , Calsequestrin , and the Ryanodine Receptor, 272, 23389–23397.

Zhang, T., Maier, L. S., Chen, L., DeSantiago, J., Brown, J. H., & Bers, D. M. (2003). Transgenic CaMKII β c overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: Reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circulation Research*, 92, 904–911.

Zhao, W., Uehara, Y., Chu, G., Song, Q., Qian, J., Young, K., & Kranias, E. G. (2004). Threonine-17 phosphorylation of phospholamban: A key determinant of frequency-dependent increase of cardiac contractility. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37, 607–612.

Zhao, W., Waggoner, J. R., Zhang, Z. G., Lam, C. K., Han, P., Qian, J., Kranias, E. G. (2009). The anti-apoptotic protein HAX-1 is a regulator of cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 20776–20781.

Zhou, Z., & January, C. T. (1998). Both T- and L-Type Ca Channels Can Contribute to Excitation- Contraction Coupling in Cardiac Purkinje Cells, 74, 1830–1839.