



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**PROTEÍNAS ASOCIADAS AL MANEJO DEL CALCIO
INTRACELULAR EN EL MIOCARDIO COMO BLANCOS
POTENCIALES DE MODIFICACIONES REDOX**

Tesista: Lic. Bárbara Soledad Román

Directora: Dra. Cecilia Mundiña-Weilenmann

Codirectora: Dra. María Matilde Said

Año: 2018



***Este trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la
Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de
La Plata, fue desarrollado en el
Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CIC)
Cátedra de Fisiología y Física Biológica
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de La Plata***

Publicación derivada del trabajo de tesis

Reversible redox modifications of ryanodine receptor ameliorate ventricular arrhythmias in the ischemic-reperfused heart.

Romina Becerra, Bárbara Soledad Román, Mariano N. Di Carlo, Juan Ignacio Mariángelo, Margarita Salas, Gina Sánchez, Paulina Donoso, Guillermo R. Schinella, Leticia Vittone, Xander H.T. Wehrens, Cecilia Mundiña-Weilenmann, Matilde Said.

American Journal of Physiology Heart Circ Physiol. 2016; 311(3):H713-24.

Presentaciones a congresos derivadas del trabajo de tesis

- Román B, Becerra R, Mariángelo JI, Salas MA, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C, Said M. Sarcoplasmic reticulum release channel (RyR2) cross-linking during reperfusion of ischemic heart: a possible pro-arrhythmogenic mechanism? 38th World Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS), 1-5 de agosto, Rio de Janeiro, Brasil 2017. Presentadora.
- Becerra R, Román B, Mariángelo JI, Salas M, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C, Said M. Arritmias cardíacas inducidas por reperfusión y su relación con la pérdida espontánea de calcio del retículo sarcoplasmático. Reunión conjunta de XXIV Congreso Argentino de Hipertensión Arterial y XXIV LAT-ISHR Scientific Meeting, 20-22 de abril, Mendoza, Argentina. 2017.
- Román B, Becerra R, Salas MA, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C, Said M. Influencia de los cambios oxidativos sobre la actividad del canal liberador de calcio (RyR2) durante la isquemia y reperfusión miocárdica. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología 2016. Physiological Mini Review 2016, Special Issue Vol. 9, # 8. Presentadora.
- Becerra R, Román B, Di Carlo M, Mariángelo JI, Salas M, Sánchez G, Donoso P, Schinella GR Vittone L, Mundiña Weilenmann C, Said M. Reversible redox modifications of ryanodine receptor ameliorate ventricular arrhythmias in the ischemic-reperfused heart. XXII ISHR World Congress, 18-21 de abril, Ciudad Autónoma de Bs As, Argentina. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 98, S1-S85, 2016.
- Roman B, Herrero A, Becerra R, Di Carlo M, Salas M, Vittone L, Said M, Mundiña-Weilenmann C. Oxidaciones del receptor de rianodina cardíaco (RyR2) en la isquemia-reperfusión: ¿Protección o daño? Physiological Mini Review 2014, Special Issue Vol.7 (#19), Pag, 49. Presentadora.

- Román BS, Schinella G, Becerra R, Said M, Mundiña-Weilenmann C. Oxidaciones del receptor de rianodina en el modelo de corazón atontado. II Congreso Internacional de Medicina, 12-14 noviembre de 2015, Facultad de Cs. Médicas de La Plata. Presentadora.
- Herrero A, Román B, Becerra R, Cracco M, Di Carlo M, Salas M, Mundiña Weilenmann C, Vittone L, Said M. Impacto del estado redox del RyR2 en la arritmogénesis y la recuperación contráctil post-isquémica. LIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, 19-22 noviembre de 2014. Medicina Vol 74 (Sup. III): 437, 2014.
- Roman B, Herrero MA, Becerra R, Vittone L, Said MM, Mundiña-Weilenmann ¿La actividad de CaMKII se modifica por oxidación en la isquemia y reperfusión miocárdica? LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Mar del Plata, 20-23 noviembre de 2013. Medicina Vol 73 (Sup. III): (#389) pag. 203, Presentadora.

Mi reconocimiento

A las autoridades del CIC, el Dr. Martin Villa Petroff y el Dr. Alejandro Aiello, por haberme abierto las puertas del Instituto, por la predisposición y atención que siempre me brindaron. Por fomentar el buen compañerismo y las buenas relaciones, haciendonos sentir como una gran familia.

A CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por haberme otorgado la beca doctoral para poder realizar este trabajo de Tesis Doctoral y por el apoyo que otorgaron a nuestro grupo para promover la investigación,

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, que me aceptaron en la Carrera de Doctorado en la misma Facultad que me formó como Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular.

Agradecimientos

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable pensar que este mérito no llega sólo y que si bien la mayoría del esfuerzo es de uno, esta Tesis hubiese sido imposible sin la participación, el aporte y apoyo de personas que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer a mis padres infinitamente por creer en mí, por no dejarme nunca bajar los brazos, por estar ahí para abrazarme y darme ese consejo que me permitió seguir siempre con una sonrisa luchando por mis sueños. Por ser el ejemplo y el motor en mi vida.

A mis hermanos Nico y Maylén, por todo lo que me acompañaron en este camino, el aguante y hacer de toda caída un momento de alegría.

A ese núcleo familiar compuesto de tíos, primos y ahijado que me completan y están conmigo incondicionalmente alentándome en todo desafío.

A mis formadores, personas de gran sabiduría quienes se han esforzado por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro: la Dra Cecilia y Dra. Matilde.

A la Dra. Cecilia, mi directora, por haberme aceptado como su becaria y ser mi guía para desarrollar este trabajo de tesis. Por su compromiso en mi formación profesional y criterio científico.

A la Dra. María Matilde Said, mi co-directora de tesis doctoral, por transmitirme todos sus conocimientos y experiencias, le agradezco su paciencia infinita, esfuerzo y compromiso en todo momento, siendo un pilar fundamental en mi aprendizaje.

A Romi Becerra por ser mi primera maestra en el laboratorio y transmitirme todos tus conocimientos con paciencia y alegría, dándome un sólido cimiento a mis primeros pasos en mi desarrollo experimental. Gracias Ro por estar siempre ahí, por ser una amiga en la que pude contar en todo momento, sin vos mucho de esto no hubiera pasado.

Al Dr. Guillermo Schinella, por sus importantes aportes y activa participación, que sin duda ha enriquecido este trabajo de tesis. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo y por tus consejos, llenos de sabiduría y experiencia.

A Marga y Leti que ayudaron a mi formación intelectual como investigadora, gracias por marcarme de manera humana el camino a seguir y como crecer.

A Diego, Mariano y Gaby mis primeros amigos del centro y ahora de por vida, esa gente que físicamente no la ves todos los días, porque ya siguió su camino, pero esta como el primer día animándome, dándome una solución rápida y práctica, escuchándome constantemente y ayudándome a superar los momentos difíciles.

Gracias a este trabajo conocí personas increíbles como Sole, Manu, Sofi y Giga con las que compartí mis alegrías, mis días de experimento y en las cuales encontré la calma que necesitaba en mis días de furia (esos en los que a los experimentos no se les antojaba salir como pretendíamos). Esas personas que me acompañaron en este camino y que fui sumando en diferentes etapas, pero que siguen siendo significativas. Gracias por su motivación y por su aliento, por creer en mí, por hacer fácil lo difícil. Por secarme las lágrimas y convertirlas en risas. Por todos los abrazos que necesite. La vida misma que sin ustedes no hubiera sido la misma claramente

A Lusito y Ale Orloski por siempre despejarme dudas ofreciéndome sus conocimientos, aportando su grano de arena para que yo pueda ir construyendo mi propia "historia científica".

Gracias por el compromiso en mi formación profesional y en la organización y escritura de la tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio, increíblemente cuando uno escribe esto se da cuenta que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar a cada uno porque tanto ellos como yo sabemos que desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo, mates, charlas y sobre todo cariño y amistad.

Índice

Glosario.....	10
I. Introducción.....	12
1. Relevancia de las enfermedades cardiovasculares.....	13
2. Sistemas oxidantes, antioxidantes y modificaciones redox.....	15
3. Conceptos generales de la fisiología cardíaca.....	20
3.1. Acoplamiento excito-contráctil cardíaco	
3.2. Manejo de calcio	
4. Proteínas que manejan el calcio y sus modificaciones postraduccionales.....	26
4.1. Canal de calcio tipo L (CCL)	
4.2. Bomba de calcio del retículo sarcoplasmático (SERCA2a)	
4.3. Fosfolamban (PLN)	
4.4. Receptor de rianodina tipo 2 (RyR2)	
4.5. Quinasa dependiente de calcio y calmodulina II (CaMKII)	
5. Injuria por isquemia y reperfusión.....	42
5.1. Bases moleculares del atontamiento cardíaco	
5.2. Arritmias de reperfusión	
II. Hipótesis.....	49
III. Objetivo general y específicos.....	50
IV. Materiales y métodos.....	52
1. Animales.....	53
2. Perfusión de corazones.....	53
2.1. Medidas mecánicas	
2.2. Medidas eléctricas	
2.3. Protocolos experimentales	
3. Determinaciones bioquímicas.....	59
3.1. Obtención de homogenatos	
3.2. Aislamiento de vesículas de Retículo Sarcoplasmático (RS)	
3.3. Inmunodetección por western blot	
3.4. Contenido de sulfhidrilos libres de RyR2	
3.5. Medida de glutatión reducido (GSH)	
3.6. Detección de ROS	
3.7. Medida de actividad de la NADPH oxidasa (NOX)	
4. Aislamiento de cardiomiocitos.....	67
4.1. Medida de pérdida espontánea de Ca ²⁺ del retículo sarcoplasmático mediante microscopía confocal (sparks)	
5. Análisis estadístico.....	70

V. Resultados y discusión.....	71
Sección 1: Balance redox en la I/R.....	72
1.1 Evaluación del estrés oxidativo	
1.2 Discusión	
Sección 2: Modificaciones redox del RyR2.....	74
2.1 Evaluación de las modificaciones redox del RyR2 y su efecto sobre las arritmias de reperfusión	
2.2 Efectos de los diferentes tratamientos sobre la contractilidad del corazón sometido a I/R	
2.3 Discusión	
Sección 3: Modificaciones redox de la quinasa dependiente de Ca ²⁺ y CaM.....	85
3.1 Oxidación de la CaMKII	
3.2 Discusión	
Sección 4: Contribución de la fosforilación y oxidación del RyR2 a las arritmias de reperfusión y a las pérdidas de Ca ²⁺ del RS.....	89
4.1 Contribución de la fosforilación y oxidación del RyR2 a las arritmias de reperfusión	
4.2 Contribución de la fosforilación y oxidación del RyR2 a las pérdidas de Ca ²⁺ del RS en miocitos aislados sometidos a I/R	
4.3 Discusión	
VI. Conclusiones.....	93
VII. Bibliografía.....	95

GLOSARIO

AEC: Acoplamiento excito-contráctil

APO: Apocinina. Inhibidor de la NOX

AV: Nodo aurículo ventricular

Ca²⁺: Calcio

CaM: Calmodulina

CaMKII: Quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina

CCL: Canal de calcio tipo L

DHE: Dihidroetidio

DHRP: Receptor de dihidropiridina, canal de calcio tipo L

dP/dt: Primera derivada de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo

GSH: Glutación reducido

I/R: Isquemia y reperfusión

KN-92: Análogo inactivo del inhibidor de la enzima CaMKII

KN-93: Inhibidor de la enzima CaMKII

L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster. Inhibidor de la NOS

LPs: Latidos prematuros

LVDP: Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo

LVEDP: Presión diastólica final del ventrículo izquierdo

MAP: Potencial de acción monofásico

mBB: Mono bromo bimane

MPG: N-2 Mercapto propionil glicina

MsrA: Metionina sulfóxido reductasa

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NCX: Intercambiador Na⁺/Ca²⁺

NEM: N-etilmaleimida

NHE: Intercambiador Na⁺/H⁺

NS: Nódulo sino-auricular

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

NOX: NADPH oxidasa

ox-CaMKII: Especie oxidada de CaMKII

PA: Potencial de acción

PLN: Fosfolamban

PKA: Proteína quinasa A, dependiente de AMP cíclico

PKC: Proteína quinasa C

RL: radical libre

ROS: Especies reactivas del oxígeno

RS: Retículo sarcoplasmático

RNS: Especies reactivas del nitrógeno

RyR2: Receptor de rianodina

SERCA2a: Bomba ATP-asa de Ca⁺² del retículo sarcoplasmático

SN: sobrenadante

SOD: superóxido dismutasa

Spark: chispa de calcio

S2814A: ratón transgénico donde el sitio Ser2814 del RyR2 fue reemplazado por Ala (no fosforilable por CaMKII)

T-BARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Thr 17: Treonina 17

TV: Taquicardia ventricular

VI: Ventrículo izquierdo

WT: Cepa de ratón salvaje

INTRODUCCIÓN



1. Relevancia de las enfermedades cardiovasculares

De acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud las enfermedades cardiovasculares (ECV) pertenecen, a las llamadas enfermedades no transmisibles (ENT). Los últimos datos recopilados por esta organización indican que, a nivel mundial, las ECV son la principal causa de morbi-mortalidad debidas a ENT (46,1%), seguidas del cáncer (21,6%), las enfermedades respiratorias (18,4%) y la diabetes (4%), como muestra la Figura 1 (World Health Organization, 2017). Dentro de las ECV se incluyen entre otras a la cardiomiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares y arteriopatías periféricas. Diversas proyecciones anticipan que la mortalidad cardiovascular seguirá aumentando. La Organización Mundial de la Salud ha informado que, mientras no haya una disminución de los factores de riesgo tales como: obesidad, hipertensión, sedentarismo, diabetes, la cifra anual de muertes por ECV y ETN aumentará a 26,3 millones y a 55 millones en el 2030 respectivamente (World Health Organization, 2017).

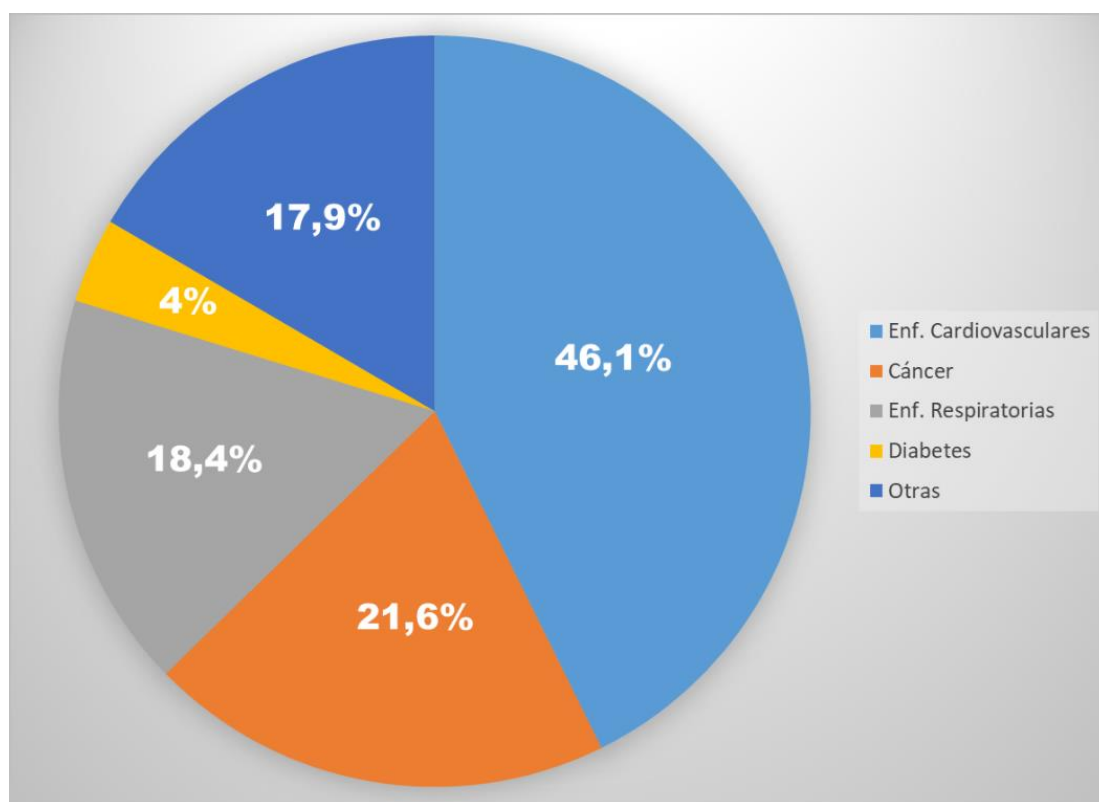


Figura 1. Mortalidad proporcional de acuerdo a la causa de muerte por enfermedades no transmisibles. Realizado a partir de los datos que brinda la World Health Organization, 2017.

Nuestro país no es ajeno a la situación observada a nivel mundial y las ECV son aquí también la principal causa de muerte. Los Indicadores Básicos de la Argentina del año 2014 muestran que las ECV generan cerca de 100.000 muertes anuales. Si tenemos en cuenta que aproximadamente la mitad se debe a cardiomiopatía isquémica coronaria, mueren por esta dolencia unas 40.000 personas por año, es decir unas 110 personas por día (Ministerio de Salud de la Nación).

Por lo expresado anteriormente es evidente que a pesar de los avances en la generación de fármacos, en la modernización de los diferentes procedimientos médicos y el mayor control de los factores de riesgo, las ECV siguen siendo la principal causa de muerte, con una incidencia y prevalencia global de dimensiones pandémicas. Es entonces imprescindible avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a las ECV, para poder así desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que resulten eficaces en la prevención de dichas patologías.

2. Sistemas oxidantes, antioxidantes y modificaciones redox

En las últimas décadas el estrés oxidativo ha sido involucrado en la patogénesis de las ECV. Se considera estrés oxidativo al desbalance entre la producción de especies oxidantes (especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS)) y la eficacia de las defensas antioxidantes presentes en mayor o menor medida en todos los tejidos (Schafer y col. 2001).

Los ROS/RNS pueden ser radicales libres (RL) o especies reactivas no radicales. Químicamente los RL al tener un electrón desapareado, tienen una alta inestabilidad y extrema reactividad. En condiciones fisiológicas, los ROS/RNS actúan como segundos mensajeros intracelulares modulando vías de transducción de señales, pero, cuando se producen en exceso, son capaces de interactuar con lípidos de membrana, proteínas y ADN, dañándolos (Proctor y col. 1984; Dröge 2002). La principal especie reactiva implicada en este daño es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), pero también pueden participar el agua oxigenada (H_2O_2), el radical hidroxilo ($HO\cdot$), el óxido nítrico (NO), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el nitroxilo (HNO).

Las especies oxidantes se producen constantemente en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa pero son también el producto de la activación de sistemas enzimáticos no mitocondriales como el de la NADPH oxidasa (NOX), la xantina oxidasa (XO) y la óxido nítrico sintasa (NOS). La célula cuenta además con sistemas buffers que previenen el daño oxidativo: atrapadores no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH), vitaminas y flavonoides, enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, tioredoxina y glutatión peroxidasa (Köhler y col. 2014).

Como se mencionó, las proteínas de la célula pueden ser afectadas por el estrés oxidativo. Aquellas que contienen mayor cantidad de cisteínas son más sensibles a los cambios redox porque los grupos tiol (-SH), que existen como tiolatos ($-S^-$) a pH fisiológico, tienden a reaccionar más rápidamente con ROS/RNS. (Donoso y Sánchez 2013). Este hecho otorga a las cisteínas y a las proteínas que las contienen, un rol especial en la biología redox. Muchas de estas proteínas están implicadas en reacciones biológicas importantes tales como fosforilación oxidativa, regulación metabólica, transducción de señales (Dröge 2002; Kumar y col. 2013; Ortiz y col. 2017).

Las modificaciones que sufren los grupos tiol pueden ser reversibles (S-glutationilación, S-nitrosilación y formación de puentes disulfuro) o irreversibles (ácido sulfénico y sulfónico) indicando estas últimas, la máxima oxidación del grupo tiol. La variedad de modificaciones redox de los grupos tiol se observa en la Figura 2 (Donoso y Sánchez 2013).

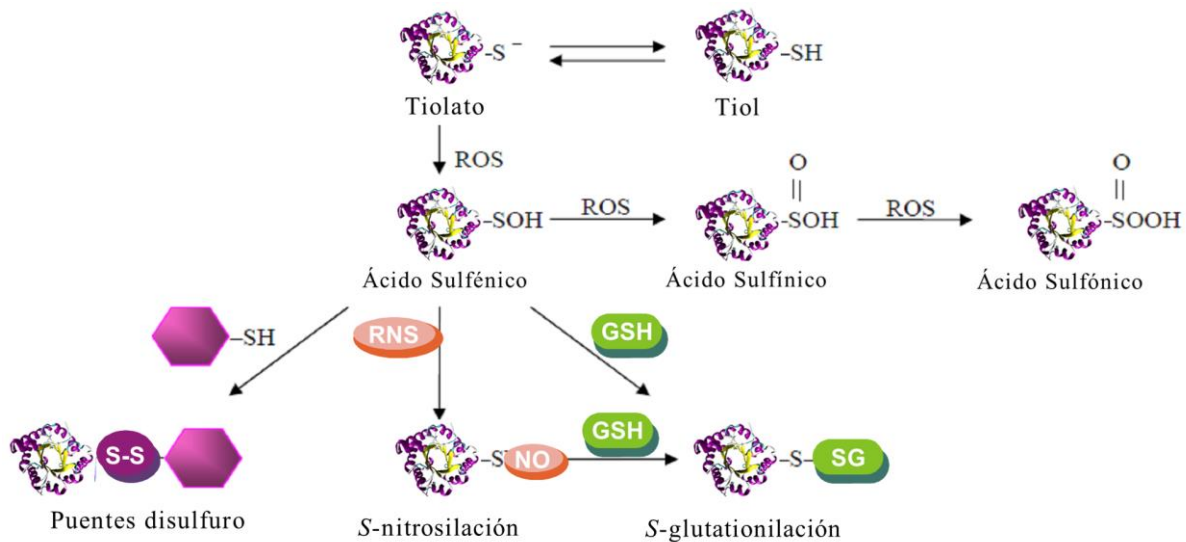


Figura 2. Posibles grados de oxidación de los grupos tiol. Los residuos de cisteína pueden ser oxidados por ROS, generando ácido sulfénico, el cual puede reaccionar con un grupo tiol de otra proteína formando un puente disulfuro, o con glutatión para convertirse en un residuo S-glutationilado o con RNS como el NO para convertirse en un residuo S-nitrosilado. Bajo fuertes condiciones oxidativas el ácido sulfénico puede transformarse en ácido sulfínico y sulfónico. Figura modificada del trabajo de Donoso y Sánchez 2013.

Dependiendo de la posición que ocupe la cisteína en la estructura cuaternaria de la proteína, su oxidación podría provocar distintos cambios estructurales y funcionales:

- 1) Si se encuentra en un sitio activo o catalítico: la oxidación puede favorecer la activación de la proteína o puede inhibirla ocasionando una pérdida de la función.
- 2) Si se encuentra en un sitio de regulación: en este caso la oxidación estaría involucrada en la modulación de la actividad de la proteína.
- 3) Si es una cisteína estructural: su oxidación puede afectar el plegado y la estabilidad de la misma por llevar a la formación de enlaces intramoleculares o con otras proteínas o afectar sitios de coordinación de metales, como los dedos de zinc.

Aunque existe considerable evidencia de las modificaciones reversibles e irreversibles de los grupos tioles de las proteínas, la identidad y la importancia fisiológica de cada una de ellas aún se desconocen (Chouchani y col. 2011).

Mecanismo de producción de las reacciones redox

La S-glutationilación es la formación de un enlace disulfuro mixto (PSSG) entre el grupo tiol de una proteína y el del GSH (Hopkins 1925). El GSH es el tiol intracelular no proteico más abundante y como ya vimos, un regulador clave del estado redox.

La S-glutationilación puede resultar de:

- la reacción directa entre el grupo tiolato (PS*) de la proteína y el radical glutatión (GS*) (Figura 3, reacción A),
- la reacción entre el grupo tiol de la proteína (PS-H) y el glutatión oxidado (GSSG) (Figura 3, reacción B), siendo éste el mecanismo más frecuente,
- la reacción entre el grupo tiol de la proteína (previamente activado), con el GSH. La activación del grupo tiol puede resultar de su oxidación a ácido sulfénico (PS-OH), por agentes oxidantes, como el H₂O₂ (Figura 3, reacción C) (Martínez-Ruiz y col. 2007).

S-Glutationilación

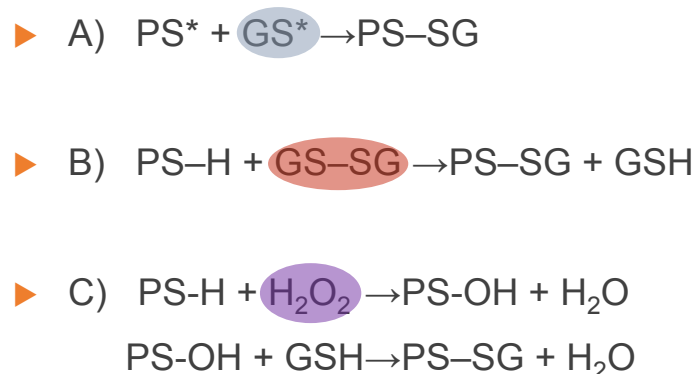


Figura 3. Reacciones que conducen a la S-glutationilación. En color se muestran las distintas especies reactivas que reaccionan con el grupo tiolato (PS*) o tiol (PS-H) de las proteínas.

De manera similar la S-nitrosilación, o unión del NO a los grupos tioles de las proteínas, no se da de manera directa. La reacción ocurre entre el tiolato de la proteína (PS*) y el NO (Figura 4, reacción A). Alternativamente, RNS como el óxido

S-Nitrosilación

- ▶ A) $PS^* + NO \rightarrow PS-NO$
- ▶ B) $N_2O_3 + PS-H \rightarrow PS-NO + H^+ + NO_2^-$
- ▶ C) $ONOO^- + PS-H \rightarrow PS-NO + H_2O$

Figura 4. Reacciones que conducen a la S-nitrosilación. En color se muestran las distintas especies reactivas que reaccionan con el grupo tiolato (PS) o tiol (PS-H) de las proteínas.*

de nitrógeno (III) (N_2O_3) y el $ONOO^-$ pueden generar la S-nitrosilación directa de los tioles de las proteínas (Figura 4, reacciones B y C) (Martínez-Ruiz y col. 2007).

Otra de las modificaciones redox que sufren los grupos tiol de las proteínas es la formación de los puentes disulfuro (SS). Estos enlaces covalentes pueden producirse entre dos cisteínas cercanas de la misma cadena polipeptídica (puentes intramoleculares) o de cadenas pertenecientes a dos proteínas diferentes (puentes intermoleculares) y ocurren cuando al menos uno de los grupos sulfhidrilo (SH) está activado por oxidación (Chung y col. 2013).

En resumen, las cisteínas de las proteínas pueden sufrir oxidaciones dependiendo de su accesibilidad, reactividad y del entorno redox (Shao D. y col. 2012). Muchas cisteínas se encuentran basalmente modificadas, otras lo hacen en respuesta a agonistas y participan en la transducción de señales y finalmente algunas se modifican ante el aumento del estrés oxidativo. Dada la naturaleza reversible y en consecuencia dinámica de la S-glutationilación, S-nitrosilación y formación de puentes disulfuro, estas modificaciones se vinculan con la señalización celular o se proponen como protectoras ante una oxidación irreversible de las

cisteínas que constituye claramente un daño permanente (Roos y col. 2011; Murphy y col. 2012; Grek y col. 2013; Yang 2014).

El daño oxidativo irreversible de las proteínas también puede ocurrir a nivel de otros residuos aminoacídicos. La reacción de los RNS con la tirosina lleva a la formación de 3-nitrotirosina (nitración), reacción que puede ocurrir además a nivel de la fenilalanina y del triptófano (Batthya'ny y col. 2017). Otro mecanismo de oxidación irreversible es la carbonilación o adición de grupos carbonilo (=CO) que ocurre principalmente en los residuos de prolina, arginina y lisina. Los derivados carbonílicos son los marcadores más usados para establecer daño oxidativo pues son más estables, se forman tempranamente y se mantienen por más tiempo (Curtis y col. 2012).

Nuestro interés principal en este trabajo estuvo dirigido a aquellas modificaciones redox que afectan a las proteínas involucradas en la regulación del Ca^{2+} intracelular en el miocardio. Para una mejor comprensión de los efectos funcionales que los cambios redox indujeron sobre ellas, se realiza a continuación una breve descripción de la fisiología cardíaca y de las proteínas implicadas en el manejo del Ca^{2+} intracelular, detallando su papel durante la contracción y relajación del miocardio.

3. Conceptos generales de la fisiología cardíaca

La función cardíaca ha fascinado al hombre desde el principio de la civilización y documentos que datan del siglo V a.C. describen ya la estructura y función mecánica del órgano. La actividad eléctrica cardíaca fue reconocida por primera vez por Kolliker y Müller en 1856 quienes observaron la contracción de los músculos de la rana inervados por el nervio ciático, cuando accidentalmente éste se puso en contacto con el corazón. En 1883 Ringer descubre el papel esencial del Ca^{+2} en la contracción. El avance científico posterior permitió trasladar el estudio y conocimiento al nivel celular. Durante las últimas décadas, la investigación sobre el corazón ha sido motivada, no sólo por el deseo de descubrir los secretos de este órgano vital, sino también por su relevancia clínica, como causal de patologías que pueden comprometer la vida.

El corazón es un órgano complejo compuesto mayormente (90%) por tejido muscular. Contiene además tejido conectivo (colágeno fibrilar, glucosaminoglucanos, integrinas, fibronectina, etc) y abundantes vasos sanguíneos ramas de las arterias coronarias. Con las cámaras vacías pesa aproximadamente 280 gramos en la mujer y 340 en el hombre. Está organizado en cuatro compartimentos, dos superiores denominados aurículas comunicándose con dos inferiores, los ventrículos. La principal función del corazón es generar un flujo de sangre a través del organismo en una forma constante y adecuada según los requerimientos tisulares.

El bombeo eficiente por parte del corazón requiere que las células que constituyen el tejido muscular cardíaco se contraigan de manera coordinada y secuencial desde las aurículas a los ventrículos. Tal proceso resulta de la interacción de cuatro propiedades fundamentales: excitabilidad (batmotropismo), automatismo (cronotropismo), conducción (dromotropismo) y contractilidad (inotropismo). El proceso de contracción es originado por un estímulo eléctrico que se propaga a través de todas las células cardíacas y que resulta finalmente en el acortamiento de los miocitos.

Tomando un criterio fisiológico, podemos considerar dos tipos de células altamente especializadas que dan sustento a las propiedades cardíacas: unas

implicadas en la generación y conducción rápida del potencial de acción (PA) y otras dedicadas a la contracción y relajación.

En las células del nodo sinusal (NS), nodo aurículo-ventricular (AV) y sistema His-Purkinje reside la capacidad de generar PA en forma automática, siendo la mayor frecuencia de descarga del NS la que determina el ritmo cardíaco en condiciones normales. Estas células se encuentran conectadas entre sí como lo muestra la Figura 5 (resaltado en verde). Los discos intercalares que las relacionan, son acoplamientos de hemicanales proteicos de baja resistencia (conexones) que forman uniones de hendidura o “uniones GAP”. Sin embargo, el acoplamiento mediado por conexones no se limita al sistema cardionector, sino que está presente en todo el corazón y permite que la despolarización alcance la membrana de cada cardiomiocito en forma casi simultánea haciendo que funcionen como una estructura sincitial (Hervé y col. 2008; Klever y col. 2014).

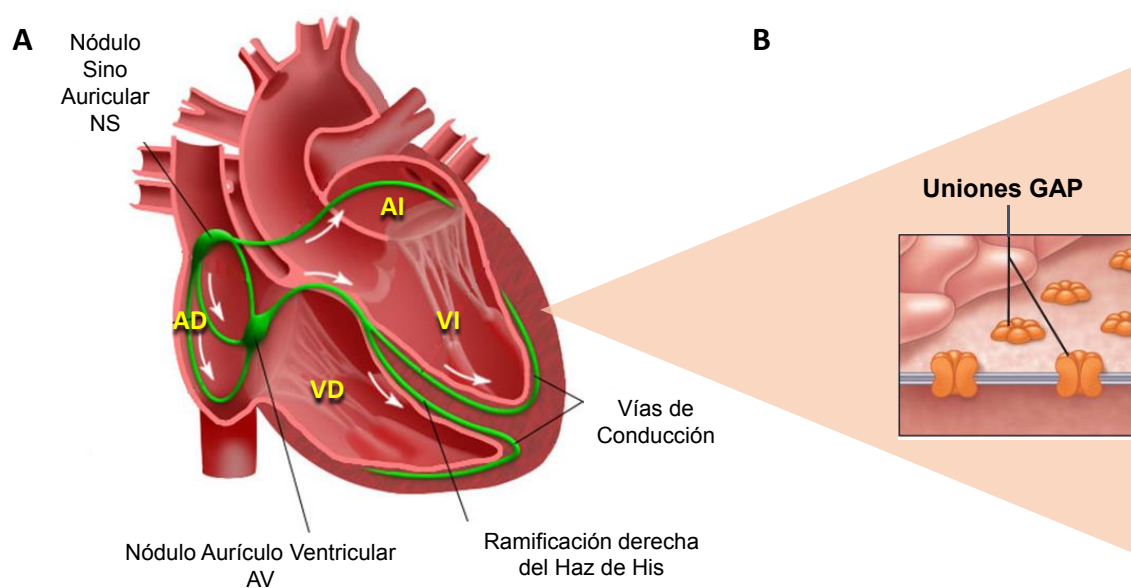


Figura 5. A) Esquema del corazón, indicando las cámaras que lo componen: aurícula derecha (AD), izquierda (AI) y los ventrículos derecho (VD) e izquierdo (VI). En verde se muestran las vías de conducción del impulso indicándose con flechas blancas, la dirección de propagación del potencial de acción. B) muestra las uniones GAP que se encuentran en todos los cardiomiocitos.

Las células musculares o cardiomiocitos son los elementos contráctiles del tejido cardíaco y están constituidos por unidades básicas de contracción denominadas sarcómeros. Los sarcómeros están a su vez compuestos por proteínas

contráctiles, filamentos finos y gruesos, que al interactuar y deslizarse generan la contracción muscular (Bers, 2001). La membrana plasmática de los cardiomiocitos (sarcolema) presenta invaginaciones cilíndricas (túbulos-T) que se extienden profundamente dentro de la célula acercándose al retículo sarcoplasmático (RS), organela involucrada en la captación, secuestro y liberación de Ca^{2+} . La porción del RS estrechamente relacionada al túbulo-T se denomina “*junctional* RS” y mide aproximadamente 10-15nm (Hayahi y col. 2009). Este minúsculo nanodominio formado por el túbulo-T y el RS se conoce como “díada”. Se ha estimado que hay aproximadamente 20.000 díadas a lo largo de un miocito cardíaco (Winslow y col. 2016).

En el túbulo-T del sarcolema se disponen los canales de Ca^{2+} tipo-L (CCL) Estos canales se hallan enfrentados al canal liberador de Ca^{2+} del RS, también denominado receptor de rianodina tipo 2 (RyR2). Esta relación espacial, como veremos luego, es de fundamental importancia en el mecanismo de la contracción miocárdica.

3.1. Acoplamiento excito-contráctil cardíaco

El acoplamiento excito-contráctil (AEC) se describe como el proceso por el cual, la membrana del cardiomiocito se despolariza generando un PA que resulta en un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico. Éste interactúa con las proteínas contráctiles, desencadenando la contracción del miocito (Bers 2001).

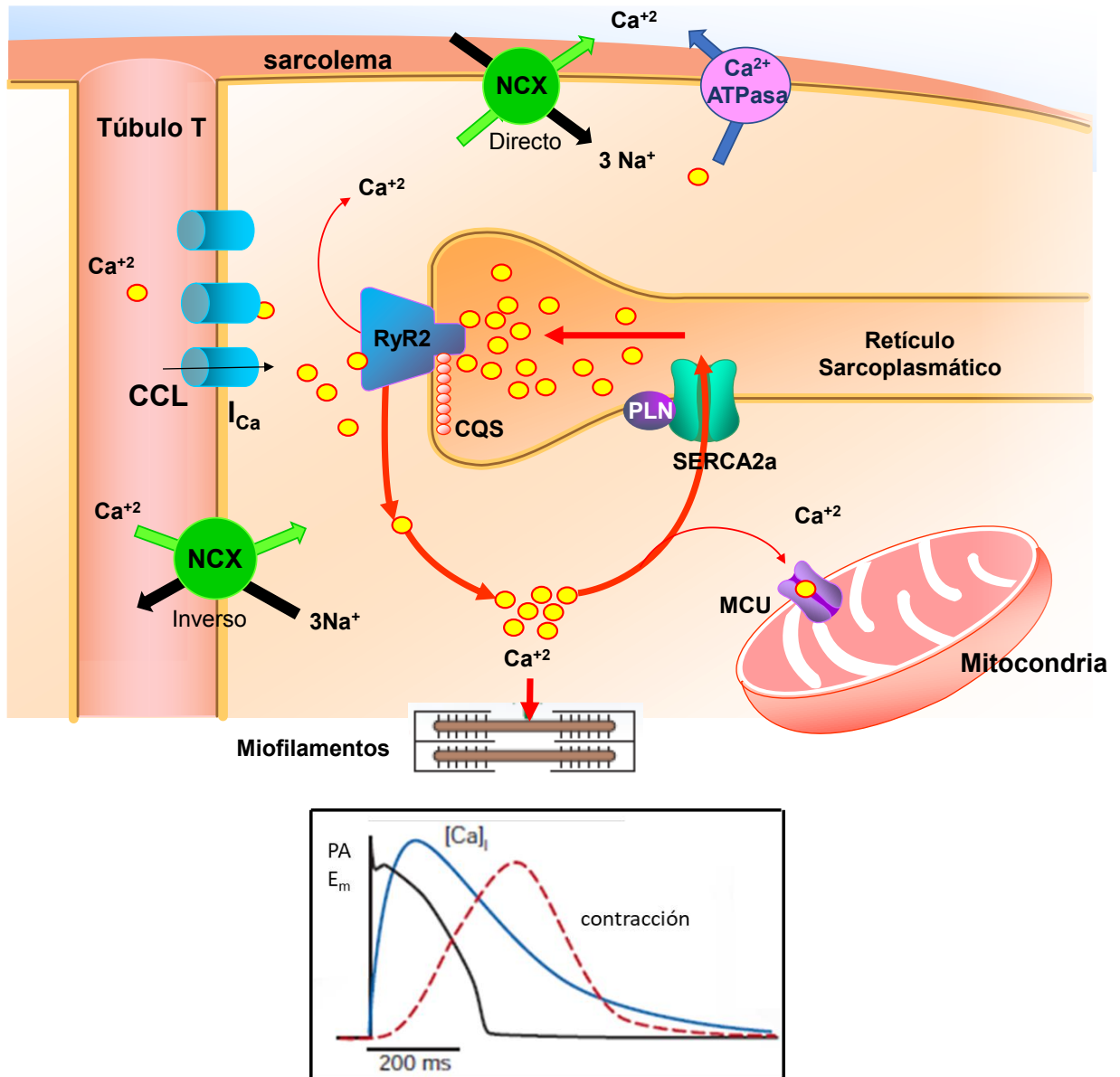


Figura 6. Acoplamiento excito-contráctil en un miocito cardíaco. Esquema de las principales proteínas y organelas involucradas en el acoplamiento: CCL (canal de Ca^{2+} tipo L), NCX (intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$); Ca^{2+} -ATPasa (del sarcolema); PLN (fosfolamban); SERCA2a (Ca^{2+} ATPasa del RS); RyR2 (Receptor de rianodina); CQS (Calsequestrina); MCU (canal de Ca^{2+} mitocondrial). El recuadro muestra el curso temporal de un potencial de acción (línea negra), el transitorio de Ca^{2+} (línea azul) y la contracción en un miocito ventricular (línea punteada roja) de conejo a 37°C (modificada de Bers y col. 2002).

Durante la fase inicial del PA, la membrana o sarcolema se despolariza, con lo cual aumenta la probabilidad de apertura de los CCL permitiendo la entrada de Ca^{2+} a la célula. La concentración incrementada del ion en ese compartimento, lleva a que se una a los RyR2 del RS desencadenando la liberación del Ca^{2+} almacenado en esta organela (Fabiato y col. 1983). De esta manera aumenta rápidamente la concentración intracelular del ion, difundiendo hacia todo el citosol. Este proceso, esquematizado en la Figura 6, ha sido clásicamente descrito como “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ”. Una vez liberado del RS, el Ca^{2+} citosólico interacciona con los miofilamentos del sarcómero y se inicia la contracción del miocito (Bers y col. 2002). Se denomina “transitorio de Ca^{2+} ” al aumento pasajero en la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) que ocurre en forma sucesiva a lo largo del ciclo cardíaco. La amplitud de los “transitorios de Ca^{2+} ” es uno de los principales determinantes del estado inotrópico de las células cardíacas.

El concepto de AEC también comprende los fenómenos relacionados con la relajación mecánica, la cual permite el ingreso de sangre y llenado diastólico de las cámaras cardíacas. Para que ocurra relajación se requiere de la disminución del Ca^{2+} citosólico que es llevada a cabo por varios mecanismos. La principal vía de remoción del Ca^{2+} del citosol es el secuestro de dicho ion hacia el RS a cargo de la Ca^{2+} ATPasa denominada SERCA2a (del inglés: *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase*), bomba de Ca^{2+} ubicada en la membrana del RS. Cuando el potencial de membrana retorna a valores más negativos, el Ca^{2+} comienza también a ser extruido del citosol por el intercambiador Na^+ - Ca^{2+} (NCX) el cual intercambia un ion Ca^{2+} por tres iones Na^+ . La Ca^{2+} -ATPasa sarcolemal, extruyendo Ca^{2+} a través de un transporte activo, y la mitocondria incorporando el Ca^{2+} citosólico a través de un canal (MCU) son dos mecanismos alternativos de poca relevancia (2-3%) en relación a los mencionados en primer término, SERCA2a y NCX (Bassani y col. 1992). A medida que la concentración de Ca^{2+} disminuye en el citosol, éste se va dissociando de las proteínas contráctiles, terminando así la fase de contracción del ciclo cardíaco.

Como consecuencia del accionar de las distintas proteínas mencionadas, el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscila normalmente entre 100nM (diástole) y 1 μ M (sístole) (Bers 2001).

3.2. Manejo de calcio

El Ca^{2+} representa una de las moléculas de transducción de señales más ubicuas de todas las que se conocen. Es capaz de mediar una diversa gama de funciones biológicas, entre ellas, la contracción muscular, la exocitosis celular, la actividad neuronal y también inducir la muerte celular programada. Desde que Ringer observó que se requería Ca^{2+} para la contracción cardíaca, el papel del Ca^{2+} como ion de señalización en el corazón se ha valorado y estudiado cada vez más (Landstrom y col. 2017).

En los cardiomiocitos, la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} depende del flujo neto de este ion a través de la membrana plasmática, de la liberación por parte del RS y de su distribución en los distintos compartimentos intracelulares, como ya se ha descrito. Al conjunto de procesos que participan en la dinámica del flujo de Ca^{2+} intracelular, se los denomina “manejo del Ca^{2+} ”. En las células cardíacas la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se encuentra en un equilibrio dinámico y estrictamente controlado, ya que es la que determina el estado inotrópico del músculo cardíaco. Hay numerosas evidencias de que las alteraciones de la homeostasis del Ca^{2+} , desempeñan un papel clave en la patogénesis de trastornos cardiovasculares tales como: la disfunción contráctil (Bers y col. 2006), hipertrofia cardíaca (Wilkins y col. 2004) y la aparición de arritmias (Clusin y col. 2003; Landstrom y col. 2017).

En las próximas secciones se describen los aspectos más relevantes de las proteínas involucradas en el manejo del Ca^{2+} intracelular.

4. Proteínas que manejan el calcio y sus modificaciones postraduccionales

4.1. Canal de calcio tipo L (CCL)

Son canales dependientes de voltaje también llamados receptores de dihidropiridinas (DHPR) por su sensibilidad a las 1,4 dihidropiridinas. Se encuentran preferentemente, como ya se mencionó, en el túbulo T del sarcolema y permiten el pasaje de Ca^{2+} desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula. Esta corriente iónica se denomina I_{Ca} .

La subunidad principal se denomina $\alpha_{1\text{C}}$ y comprende 4 dominios con 6 segmentos transmembrana cada uno. Además, a lo largo del canal se reconocen múltiples sitios de unión para diferentes subunidades auxiliares (β , α_2 , δ y γ) responsables de su modulación y regulación (Dolphin 2006; Fang y col. 2011) (Figura 7). Los extremos amino y carboxilo terminal (C-terminal) son citoplasmáticos, siendo el C-terminal fundamental para determinar la localización del canal en la membrana plasmática y su interacción con proteínas moduladoras tales como la calmodulina (CaM), la quinasa dependiente de Ca^{2+} y CaM (CaMKII) y la quinasa dependiente de AMPc (PKA) (Anderson y col. 2007; Harvey y col. 2013). La apertura de estos canales acontece cuando el potencial de membrana se despolariza y alcanza aproximadamente los -30 mV. Una vez abiertos, muestran una elevada conductancia para luego sufrir una lenta inactivación dependiente de voltaje y de Ca^{2+} , a través de su unión a la CaM asociada al canal (Halling y col. 2005; Bers 2001). Esto limita la cantidad de Ca^{2+} que ingresa en cada PA para inducir la liberación de Ca^{2+} del RS.

La actividad del CCL se regula por fosforilación a través de distintas quinasas. El efecto estimulador de la PKA sobre la I_{Ca} se conoce hace más de 30 años, aunque el mecanismo molecular por el que esto ocurre, aún hoy se discute (Osterrieder y col. 1982). Una de las propuestas recientes sugiere que la fosforilación liberaría la autoinhibición que ejerce el extremo distal del C-terminal de la subunidad $\alpha_{1\text{C}}$, favoreciendo así el aumento de la probabilidad de apertura del canal (Kamp y Hell 2000). Por otra parte, se ha descrito que la fosforilación por CaMKII del CCL, participaría en la facilitación del canal, fenómeno que se observa

cuando aumenta la frecuencia de estimulación. Por este mecanismo aumenta el pico de la corriente y se retrasa su inactivación por Ca^{2+} (Yuan y col. 1994; Xiao y col. 1994; Bers y col. 2014). Finalmente se ha propuesto que la proteína quinasa C (PKC) modula el CCL, aunque su rol se encuentra muy discutido: mientras hay trabajos que afirman que estimula la I_{Ca} , otros demuestran efectos inhibitorios (McHugh y col. 2000; Kamp y Hell 2000).

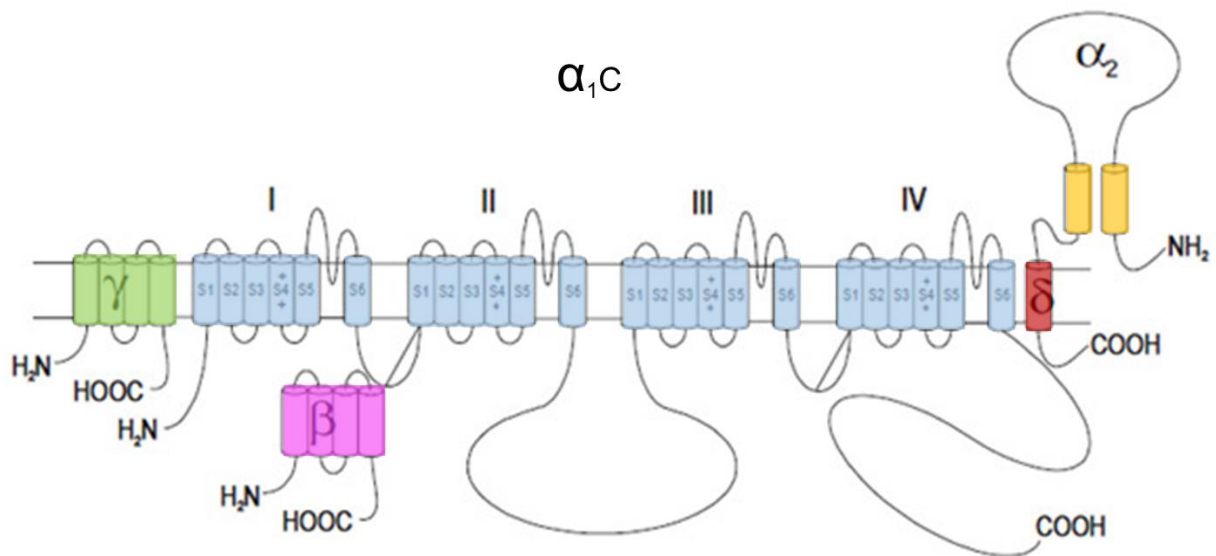


Figura 7. Estructura del canal de calcio tipo L. La subunidad principal es la α_1C (celeste) compuesta por 4 dominios, cada uno de los cuáles contiene 6 segmentos transmembrana. Las subunidades β citosólica (fucsia), α_2 extracelular, (amarilla), δ (rojo) y γ (verde) regulan las propiedades del canal.

La subunidad α_1C formadora del poro del CCL cardíaco contiene varios residuos de cisteína que pueden potencialmente someterse a modificaciones redox (Cserne Sappanos y col. 2017). En sistemas de expresión heterólogos (células HEK293, Hu y col. 1997) y en cardiomiocitos (Gill y col. 1995) se demostró que los ROS/RNS son capaces de oxidar irreversiblemente a los grupos tiol de los residuos de cisteína disminuyendo así I_{Ca} . Otros investigadores, han informado sin embargo, que los agentes tiol-oxidantes aumentan I_{Ca} (Song y col. 2010). Estas discrepancias pueden deberse, en parte, a que CaMKII, PKA y PKC pueden activar I_{Ca} por fosforilación y las tres quinasas pueden activarse por oxidación dependiente de ROS. Por lo tanto, los ROS pueden inducir simultáneamente la activación de I_{Ca} vía proteínas quinasas y/o su inhibición vía oxidación directa de cisteínas (Wagner y col. 2013).

4.2. Bomba de calcio del retículo sarcoplasmático (SERCA2a)

Es una proteína con actividad ATPasa, ubicada en la membrana del RS cuya función es el transporte activo de Ca^{2+} desde el citosol hacia el lumen del RS. Posee una masa molecular de 110 kDa de la cual el 70% se localiza del lado citosólico. Dentro de su estructura se describen diferentes dominios con funciones específicas (Figura 8): un sitio de anclaje a la membrana, un dominio al que se une el ATP (N), un dominio de fosforilación (P) altamente conservado que es fosforilado durante los ciclos de transporte y un dominio (A) que controla el movimiento de la enzima durante los cambios conformacionales que se producen a lo largo del ciclo catalítico (Olesen y col. 2007).

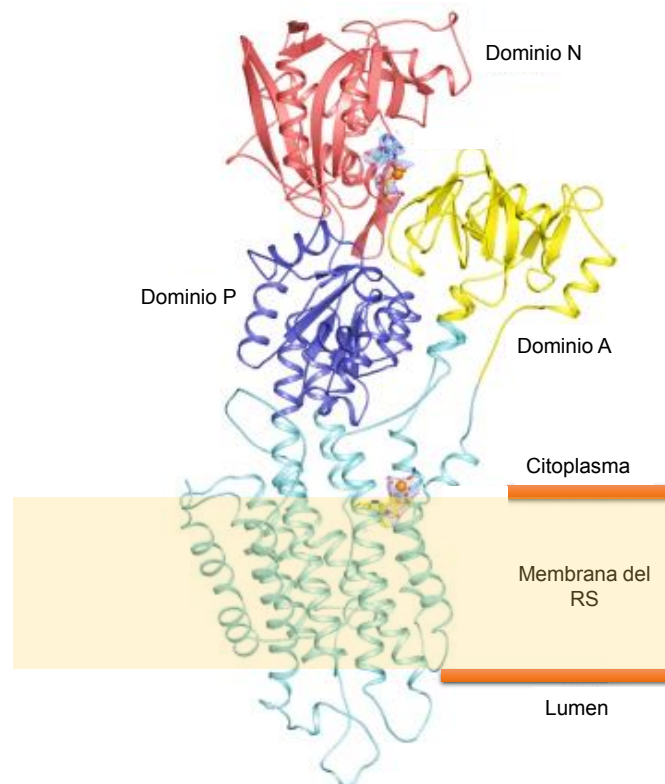


Figura 8. Esquema de la estructura de SERCA2a.

De las diferentes isoformas, el corazón expresa la SERCA2, principalmente la variante 2a. La cantidad de SERCA2a presente en el tejido está sujeta tanto a diferencias regionales como a modificaciones durante el desarrollo, el envejecimiento o a la existencia de patologías cardíacas. Por ejemplo se ha

demostrado que disminuye en la insuficiencia cardíaca. Su funcionamiento tiene impacto sobre la velocidad de relajación ya que remueve el Ca^{2+} del citosol y sobre la contractilidad al determinar la cantidad de Ca^{2+} del RS disponible para la próxima contracción (Frank y col. 2003). El proceso de transporte del Ca^{2+} por parte de SERCA2a, descrito en la Figura 9, se basa en cambios cíclicos entre dos estados conformacionales que se denominan E1 y E2. El mecanismo se inicia con la unión del Ca^{2+} a los sitios citoplasmáticos (conformación E1). Luego ocurre la hidrólisis del ATP y la fosforilación de la bomba en el aspartato de la posición 351. Este fenómeno da lugar a una serie de cambios conformacionales que determinan que el Ca^{2+} pierda contacto con el citoplasma y tenga acceso al lumen del RS (estado E2). En el estado conformacional, E2, la bomba tiene menos afinidad por el ion y lo libera a la luz del RS. La pérdida del fosfato de la SERCA2a y la unión a otra molécula de ATP da lugar nuevamente a la conformación E1.

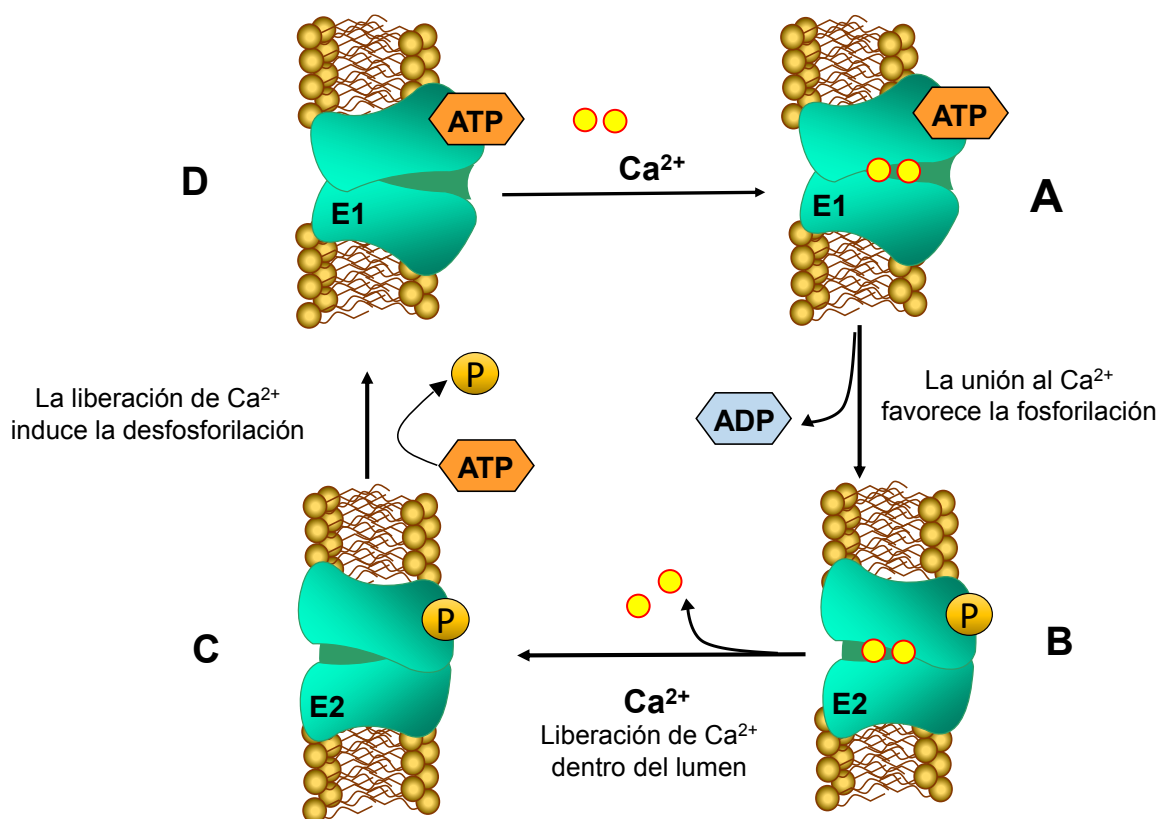


Figura 9. Esquema cíclico de los cambios conformacionales de SERCA2a durante el transporte de Ca^{2+} . A) El Ca^{2+} se une a los sitios que se encuentran cerca del centro de la porción transmembrana y accesibles desde el citoplasma en la conformación E1. B) Tras la unión del Ca^{2+} ocurre la hidrólisis de ATP y la bomba se fosforila, pasando al estado conformacional E2 permitiendo la liberación del Ca^{2+} al interior del RS. C) Tras la liberación del Ca^{2+} , la bomba se desfosforila. D) La desfosforilación da lugar a la conformación inicial E1 que se asocia a una nueva molécula de ATP. (Olesen y col. 2007).

La función de SERCA2a puede ser modulada por diversos factores, entre los que se pueden mencionar su fosforilación (Xu y col. 1999) y la interacción con otras proteínas como el sustrato del receptor de insulina, S100A1, proteína fijadora de Ca^{2+} rica en histidina (HRC) y HAX-1 entre otras (Algenstaedt y col. 1997; Vandecaetsbeek y col. 2009; Kranias y Hajjar 2012). Modificaciones redox también pueden alterar la actividad de la bomba de Ca^{2+} SERCA2a. Algunos residuos de cisteína están basalmente S-nitrosilados y parecen contribuir a su normal funcionamiento (Bencsik y col. 2008). Se ha demostrado que bajos niveles de ROS/RNS oxidan reversiblemente a la SERCA2a y la activan (S-glutationilación de la cisteína 674) (Adachi y col. 2004; Lancel y col. 2009) mientras que oxidaciones más severas como la nitración inhiben su función (Knyushko y col. 2005; Lokuta y col. 2005).

Sin embargo, el principal factor de modulación de la actividad de la bomba es su interacción con la fosfoproteína fosfolamban (PLN) (Kirchberber y col. 1975) la cual, en su estado desfosforilado, inhibe a la SERCA2a. Se ha visto que en patologías como la insuficiencia cardiaca, donde el nivel de estrés oxidativo es alto, PLN puede inhibir a SERCA2a por un mecanismo redox dependiente denominado "*cross-linking*". Así, la lisina 27 de PLN puede formar un enlace covalente con la cisteína 318 de SERCA2a, estabilizándola en la conformación E2, conformación que tiene baja afinidad por el Ca^{2+} (Chen y col. 2003; Akin y Jones 2011).

4.3. Fosfolamban (PLN)

Es una proteína ubicada en la membrana del RS, compuesta por 52 aminoácidos. Como se observa en la Figura 10 puede encontrarse en forma de monómero de 6 kDa, forma activa que inhibe la actividad de SERCA2a, o bien constituyendo homopentámeros (reserva de monómeros) conformación que anula su regulación sobre la bomba de Ca^{2+} (Kranias y Hajjar 2012). Su nombre deriva del griego “fosfato” y “lambano” que significa “que recibe fosfatos” (Katz 1998).

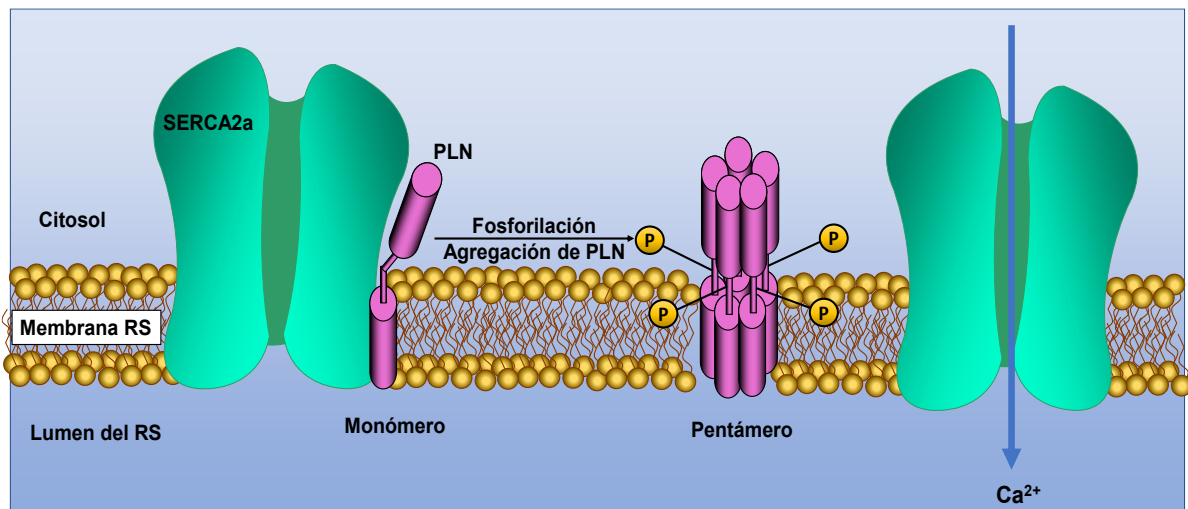


Figura 10. Estados conformacionales en los que se encuentra PLN. En estado monomérico se asocia a SERCA2a inhibiendo así el transporte de Ca^{2+} desde el citosol hacia el lumen del RS. Su fosforilación favorece su pasaje a la forma pentamérica. (Kranias y Hajjar 2012).

Estructuralmente puede dividirse en dos dominios: a) un dominio I (hidrofílico) que abarca los aminoácidos 1 al 30 y que contiene los sitios fosforilables: serina16 fosforilado por PKA y treonina 17 fosforilado por CaMKII (Simmerman y col. 1986; Drago y col. 1994) y b) un dominio II (hidrofóbico) que comprende los aminoácidos 31 a 52 conformando una hélice alfa transmembrana que ancla esta proteína a la membrana del RS (Figura 11). Dentro de esta región han sido identificados residuos de cisteína, leucina e isoleucina que son críticos para la formación del homopentámero (MacLennan y col. 1998). Esta zona participa además, en el efecto inhibitorio de PLN sobre la SERCA2a (Kimura y col. 1997).

La fosforilación de la PLN favorece el pasaje a su forma pentamérica (Figura 10) y libera así a la SERCA2a del efecto inhibitorio que los monómeros ejercen sobre ella.

Estudios del grupo de Froehlich y col. (2008) en microsomas de células de insecto que co-expresaban SERCA2a y PLN, mostraron que la actividad de la bomba puede ser modulada por un mecanismo independiente de la fosforilación de PLN, que implica la oxidación de los grupos tiol en los monómeros de esta proteína inhibitoria. Un trabajo posterior de Sivakumaran y col. (2013) usando nitroxilo como agente oxidante, demostró que la aparición de dímeros, trímeros y tetrámeros de PLN, formados por enlaces disulfuro entre las cisteínas de los monómeros, ocurría acompañada con un efecto lusitrópico e inotrópico positivos en miocitos aislados. Los investigadores atribuyeron a la incapacidad de los oligómeros de PLN de inhibir la SERCA2a, los efectos mecánicos encontrados. Pero también se propuso la formación de enlaces covalentes entre las cisteínas de las dos proteínas que forman el complejo SERCA2a/PLN (Chen y col. 2003). En este caso la modificación redox llevo a una inactivación de la bomba (Akin y Jones 2012).

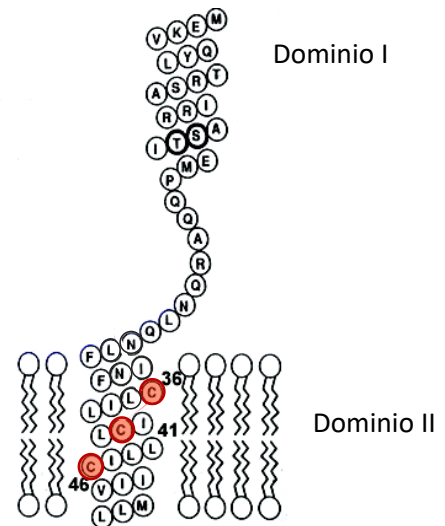


Figura 11. Estructura de PLN. Se representa la secuencia aminoacídica y el plegamiento de la proteína con sus dominios. Se indican con color las cisteínas que estarían involucradas en la formación de los oligómeros. Modificada de Froehlich y col. 2008.

4.4. Receptor de Rianodina tipo 2 (RyR2)

Este es el canal iónico más grande conocido hasta el momento. Es un homotetrámero, donde cada monómero está constituido por 4.967 aminoácidos pesando aproximadamente 565 kDa. Cada subunidad contiene de 6 a 8 segmentos transmembrana localizados en el extremo C-terminal. Esta porción representa aproximadamente el 10% de la proteína y es la que forma el poro del canal; el 90% restante está representado por un dominio citosólico que sirve de anclaje para un conjunto de subunidades regulatorias y enzimas que modulan la función del canal como muestra la Figura 12 (Zalk y col. 2007).

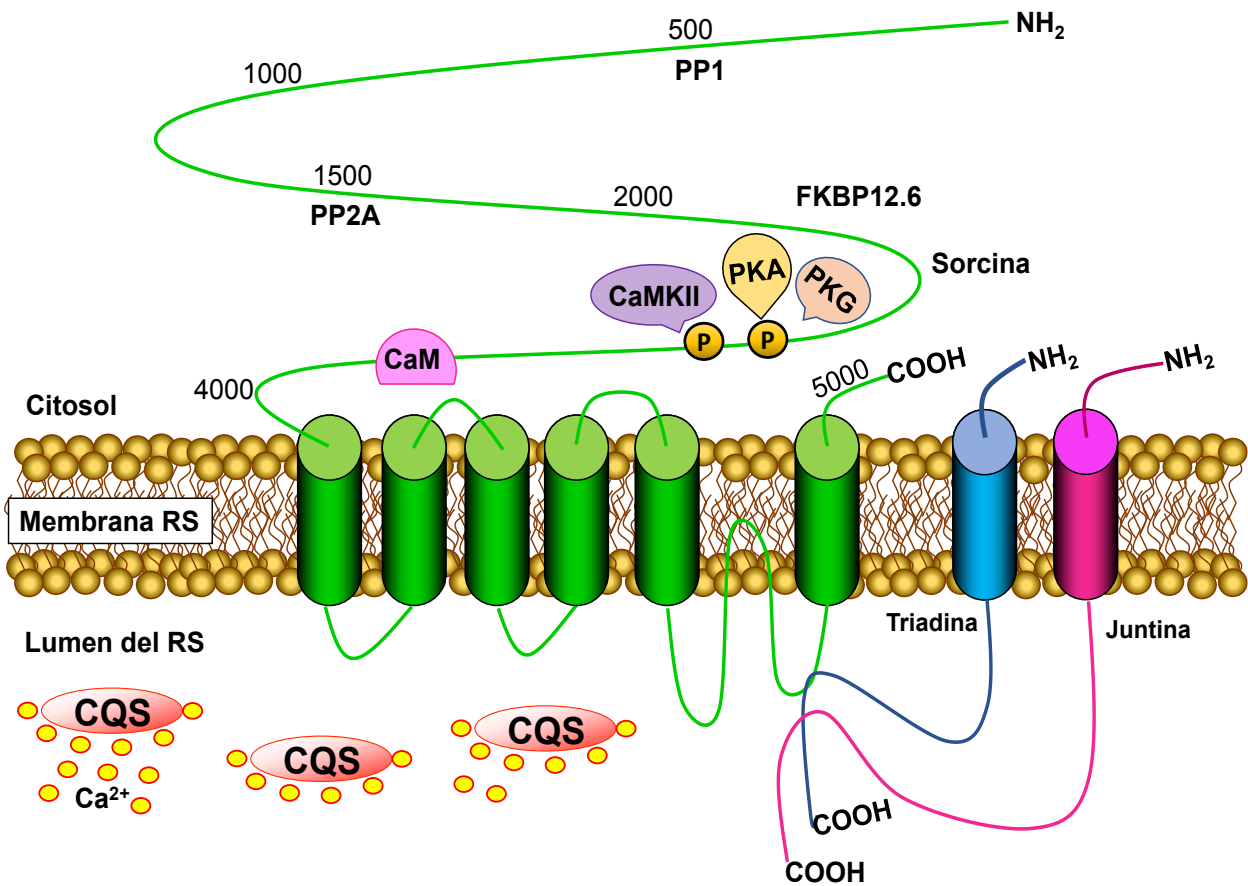


Figura 12. Esquema de la estructura de un monómero de RyR2 (verde). El monómero presenta 6 dominios transmembrana. La porción citosólica interacciona con varias proteínas como las fosfatasas PP1, PP2A, CaM y calstabin (FKBP12.6); también se encuentran allí los sitios consenso para la fosforilación por PKA, CaMKII y PKG. En el lumen del RS, RyR2 interacciona con proteínas como triadina, juntina y calsecuestrina (CQS).

Debido a su gran tamaño, la proteína no ha podido ser completamente cristalizada, por lo tanto, su estructura y su función, vienen siendo estudiadas por décadas, utilizando una gran variedad de técnicas y diseños experimentales. Gracias a su afinidad por el alcaloide rianodina (proveniente de la planta *Ryania speciosa*) el canal pudo ser purificado y localizado en la membrana del RS, considerándose como una unidad liberadora de Ca^{2+} desde la organela hacia el citosol. Datos recientes de microscopía óptica de alta resolución muestran que los RyR2 cardíacos se encuentran formando grupos («racimos» o *clusters*) con una disposición cuasi-cristalina (Baddeley y col. 2009) en estrecha relación con los CCL aunque sin contacto físico como ocurre en el músculo esquelético (Rueda y col. 2014).

Este canal es un gran complejo macromolecular siendo el Ca^{2+} el agonista fisiológico que permite su apertura. El RyR2 puede ser regulado por varias proteínas asociadas tanto a la porción citosólica como a la porción luminal. Dentro de las proteínas citosólicas más importantes se describen: la CaM, que al unirse al receptor inhibe la liberación de Ca^{2+} (Balshaw y col. 2002; Yang y col. 2014); la FKB12.6 que estabiliza el estado cerrado del canal (Marx y col. 2000; Kushnir y Marks 2010) y la sorcina inhibidora de la actividad del canal (Farrell y col. 2003). Entre las proteínas lumbinales se encuentran triadina, junctina y calsequestrina las cuales junto con el RyR2 forman un complejo cuaternario capaz de censar el contenido luminal de Ca^{2+} y modular la probabilidad de apertura del canal (Györke y col. 2004). A su vez el RyR2 puede estar regulado por iones (Mg^{2+} , H^+) y pequeñas moléculas como el ATP.

La actividad del RyR2 también puede estar modulada por fosforilación. El canal presenta múltiples sitios consensos para su fosforilación por diferentes quinasas (Camors y Valdivia 2014). Uno de los primeros residuos de fosforilación estudiados fue la serina 2808 (Witcher y col. 1991), sitio que según muestran la mayoría de las evidencias es fosforilado principalmente por PKA, pero puede serlo también por CaMKII (Ferrero y col. 2007). Recientemente se ha propuesto que este residuo podría ser un blanco de la proteína quinasa dependiente de GMP cíclico (PKG) (Ho y col. 2016). Wehrens y col. (2004) describieron el sitio de fosforilación serina 2814, que hasta ahora parece ser sustrato específico de CaMKII. Por último, la serina 2030 es preferencialmente fosforilada por PKA (Xiao y col. 2005). Las

consecuencias funcionales de la fosforilación de dichos residuos no están completamente dilucidadas. El papel de la serina 2808 sigue siendo muy controversial. Un grupo de investigadores sostiene que su hiperfosforilación por PKA en corazones insuficientes humanos y caninos es el mecanismo subyacente responsable de la disfunción cardíaca (Marx 2000). Sin embargo, otros grupos no han podido confirmar estos hallazgos (Jiang y col. 2002; Huke y Bers 2008; George 2008). Por el contrario, hay consenso entre diferentes investigadores sobre los efectos de la fosforilación de la serina 2814 por CaMKII. Se ha demostrado que esta modificación post-traducciona l induce la fuga de Ca^{2+} diastólica y la actividad arritmogénica tanto en la insuficiencia cardíaca como en otras patologías (Maier y col. 2003; Ai y col. 2005; Guo y col. 2006; Curran y col. 2010; Luo y Anderson 2013; Rueda y col. 2014). En el caso de la serina 2030, se describen bajos niveles de fosforilación basal que al aumentar por la activación de PKA incrementan la sensibilidad del RyR2 al Ca^{2+} luminal (Xiao y col. 2005 y 2006). Estudios en ratones con ablación genética de dicho sitio (S2030A-RyR2) llevados a cabo por Valdivia y col. están intentando confirmar su rol funcional “*in vivo*”.

La actividad del RyR2 también puede regularse por modificación de su estado redox (Meissner 2004; Hidalgo y col. 2005). El canal contiene 89 residuos de cisteína por monómero, de los cuales aproximadamente 21 son susceptibles de ser oxidados (Xu y col. 1998). Diferentes autores demostraron que el RyR2 está S-nitrosilado (Xu y col. 1998) y S-glutationilado (Sánchez y col. 2008) en condiciones basales siendo factible además la formación de puentes disulfuro entre sus monómeros (en inglés: *cross-linking*) (Mazurek y col. 2014). Cuando la concentración de ROS/RNS aumenta, estas modificaciones pueden acentuarse o generarse oxidaciones más severas (irreversibles) de los grupos tiol de las cisteínas. En un entorno con mayor poder oxidante, también pueden ocurrir oxidaciones de otros aminoácidos del RyR2 como la carbonilación (Xie y col. 2015; Wang y col. 2015). Todas estas oxidaciones se esquematizan en la Figura 13.

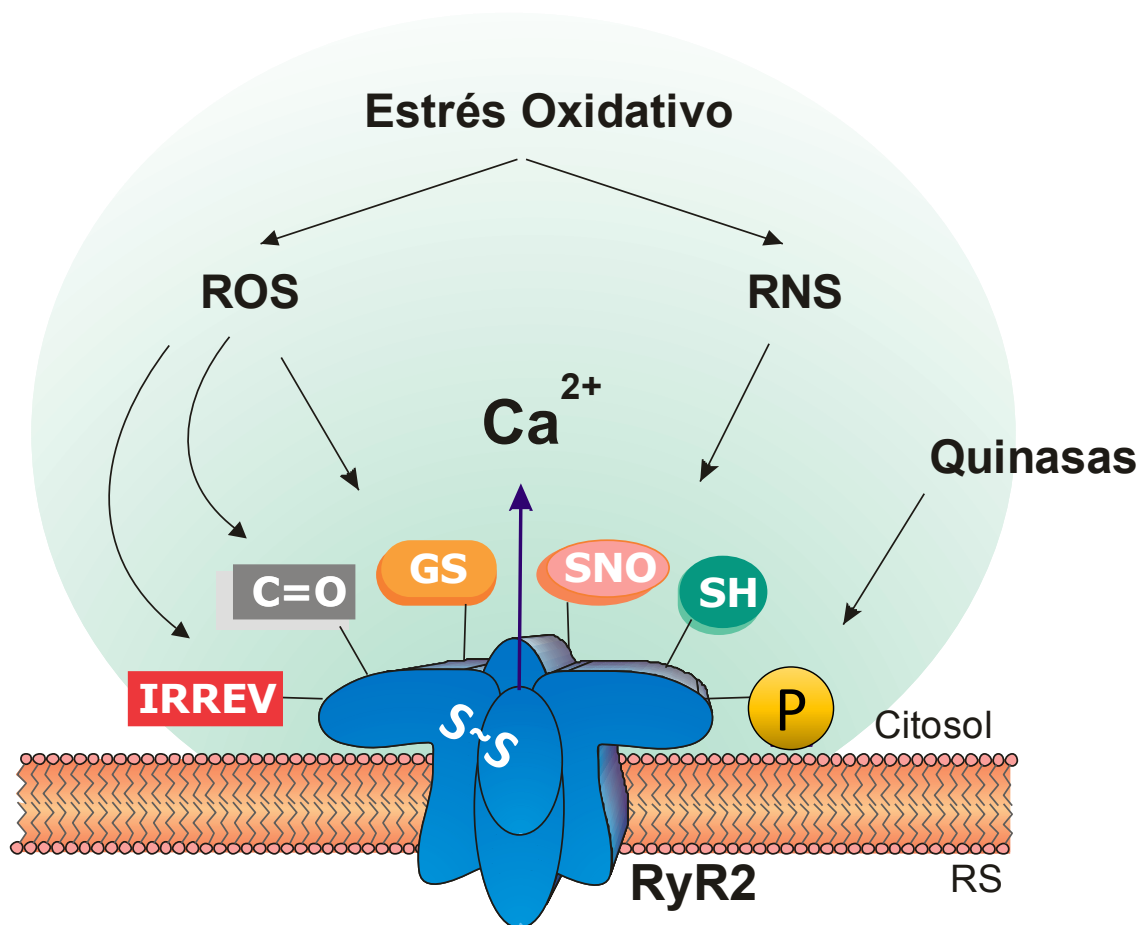


Figura 13. Esquema que muestra las posibles modificaciones postraduccionales del RyR2. Las siglas indican: carbonilación (C=O), glutacionilación (GS), nitrosilación (SNO), fosforilación (P), oxidaciones irreversibles (IRREV), puentes disulfuro (S~S) y también se indican los sulfhidrilos libres de las cisteínas disponibles para ser modificados (SH).

Mientras hay coincidencia entre los investigadores respecto a que la oxidación irreversible del RyR2 aumenta su actividad (Shao y col. 2012; Niggli y col. 2013; Wang y col. 2015), el impacto de los cambios redox reversibles sobre la función del canal sigue siendo controvertido (Ziolo y col. 2001; Mészáros 2004; Gonzalez y col. 2007; Sánchez y col. 2008; Wang y col. 2010; Cutler y col. 2012, Donoso y col. 2014).

Sánchez y col. (2008) describieron un aumento de la S-glutacionilación del RyR2 en el ejercicio y atribuyeron a esta modificación, el incremento de la liberación de Ca^{2+} del RS en sístole y la disminución de su pérdida en diástole. Los autores sugirieron que este cambio redox del RyR2 podría tener un efecto beneficioso cuando la demanda aumenta, mejorando la liberación fraccional de Ca^{2+} en cada

latido. Por otro lado, son numerosos los trabajos que estudian la S-nitrosilación del RyR2 y se describen efectos tanto estimulatorios como inhibitorios sobre la actividad del canal (Ziolo y col. 2001; Gonzalez y col. 2007; Lim y col. 2008; Wang y col. 2010; Gonzalez y col. 2010; Cutler y col. 2012). Quizás la explicación más aceptada que ha permitido reconciliar los diferentes resultados hallados es que el impacto de la S-nitrosilación sobre la función del RyR2 depende de manera crítica del balance ROS/RNS en su entorno (Belevych y col. 2013).

Por último, trabajos recientes indican que la formación de puentes disulfuro entre subunidades del RyR2 se asocia con una mayor probabilidad de apertura del canal, estudiada en bicapa lipídica, y un aumento de la pérdida de Ca^{2+} por el RS en miocitos aislados (Mazurek y col. 2014; Zima y col. 2016). Los autores sugieren que esta modificación redox impediría la dinámica entre las subunidades que es necesaria para la apertura y el cierre óptimos del canal.

Como ya describimos, durante el AEC la apertura del RyR2 como consecuencia del incremento del Ca^{2+} en el espacio diádico, permite la salida de este ión desde el RS. En diástole, contrariamente a lo que se pensaba, el RyR2 no permanece completamente cerrado, sino que puede liberar pequeñas cantidades de Ca^{2+} . Este fenómeno dado su carácter local y transitorio es conocido como fuga diastólica de Ca^{2+} o chispa (en inglés: " Ca^{2+} spark") y puede ser monitoreado por microscopía confocal (Figura 14A) (Chen y col. 1993). Está demostrado que tanto la sobrecarga de Ca^{2+} del RS, como las modificaciones del RyR2 inducidas por fosforilación y/o alteración del estado redox, aumentan la frecuencia de chispas (Rueda y col. 2014). Como se describirá más adelante, esta alteración de la fuga diastólica de Ca^{2+} , puede generar ondas de Ca^{2+} (en inglés: " Ca^{2+} waves") que activan al intercambiador NCX (Figura 14B). Debido a la naturaleza electrogénica de este mecanismo (intercambia 3 iones Na^+ por 1 ion Ca^{2+}), su accionar genera una corriente despolarizante que eventualmente termina desencadenando una actividad arrítmica (Pogwizd y col. 2001).

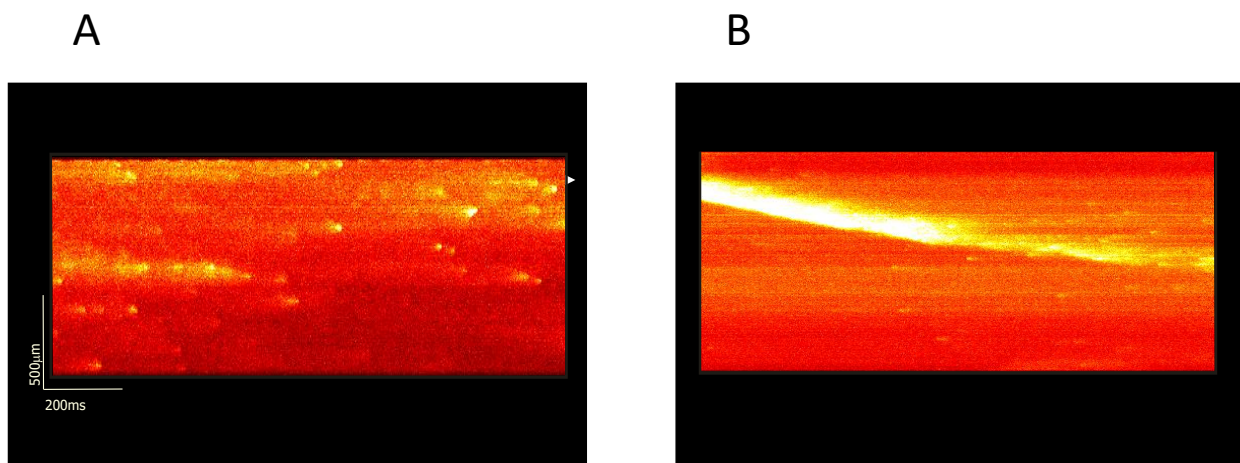


Figura 14. Imágenes representativas de fugas de Ca^{2+} desde el RS en miocitos cardíacos cargados con el indicador Fluo-3. A) Barrido del microscopio confocal de una célula sin estimular, donde se observan chispas de Ca^{2+} en diástole (puntos más brillantes). B) Imagen bidimensional de una onda de Ca^{2+} .

4.5. Quinasa dependiente de calcio y calmodulina II (CaMKII)

Es una proteína serina/treonina quinasa, que depende de Ca^{2+} y CaM para su activación. Se expresa en todos los tejidos y existen diferentes isoformas, que derivan de cuatro genes distintos: α , β , γ y δ . La isoforma predominante, pero no exclusiva en corazón es la δ y ésta a su vez tiene dos variantes de *splicing* δ_B y δ_C que se expresan en diferentes compartimentos. La primera posee un péptido señal que la ubica preferentemente en núcleo, mientras que δ_C se encuentra en el citosol. Tridimensionalmente se organiza en el espacio como un dodecámero formado por dos anillos hexaméricos. Cada monómero puede subdividirse en tres dominios: del lado N-terminal se encuentra el dominio catalítico con actividad quinasa; en la zona central, el regulador, al que se une la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ y del lado C-terminal, el dominio de asociación. Esta última región permite que los monómeros se asocien entre sí para formar la holoenzima tal como puede verse en la Figura 15A (Hudmon y Schulman 2002).

Clásicamente, la activación de la enzima requiere la unión de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ al dominio regulador permitiéndole un cambio conformacional que despliega el dominio catalítico quedando así expuesto para entrar en contacto con sus sustratos.

Los propios monómeros de la CaMKII son blanco de esta actividad enzimática (Figura 15B). La autofosforilación de la treonina 287 del dominio regulatorio sostiene la actividad de la enzima, por inhibición de la re-asociación entre el dominio catalítico y regulatorio (autoinhibitorio). Erickson y colegas (2008) describieron un nuevo mecanismo de activación de la enzima, independiente de Ca^{2+} , presente en condiciones pro-oxidantes. Demostraron que las metioninas 281 y 282 en el dominio regulatorio pueden oxidarse, resultando en una activación muy similar a la autofosforilación. Esta oxidación de las metioninas es revertida por la acción reductora de la metionina sulfóxido reductasa A. Nuevos estudios sugieren que CaMKII también puede ser activada directamente por S-nitrosilación (Gutiérrez y col. 2013; Curran y col. 2014; Erickson y col. 2015). El NO podría unirse covalentemente al grupo tiol de las cisteínas 116, 273 y 290 presentes en la enzima (Gutierrez y col. 2013). Erickson y colaboradores (2015) proponen que la S-nitrosilación de la cisteína 290 activa a la CaMKII, mientras que la modificación de la cisteína 273 la inactiva.

Recientemente se ha descrito que, en condiciones de hiperglucemia, la O-N-acetilglicosilación (O-GlcNAc) del residuo serina 280 catalizada por la enzima O-GlcNAc-transferasa, conduce a la activación persistente de esta quinasa (Erickson 2014). Este modo de activación no canónica de la CaMKII podría desempeñar un papel crítico en el remodelamiento estructural y eléctrico del corazón del paciente diabético.

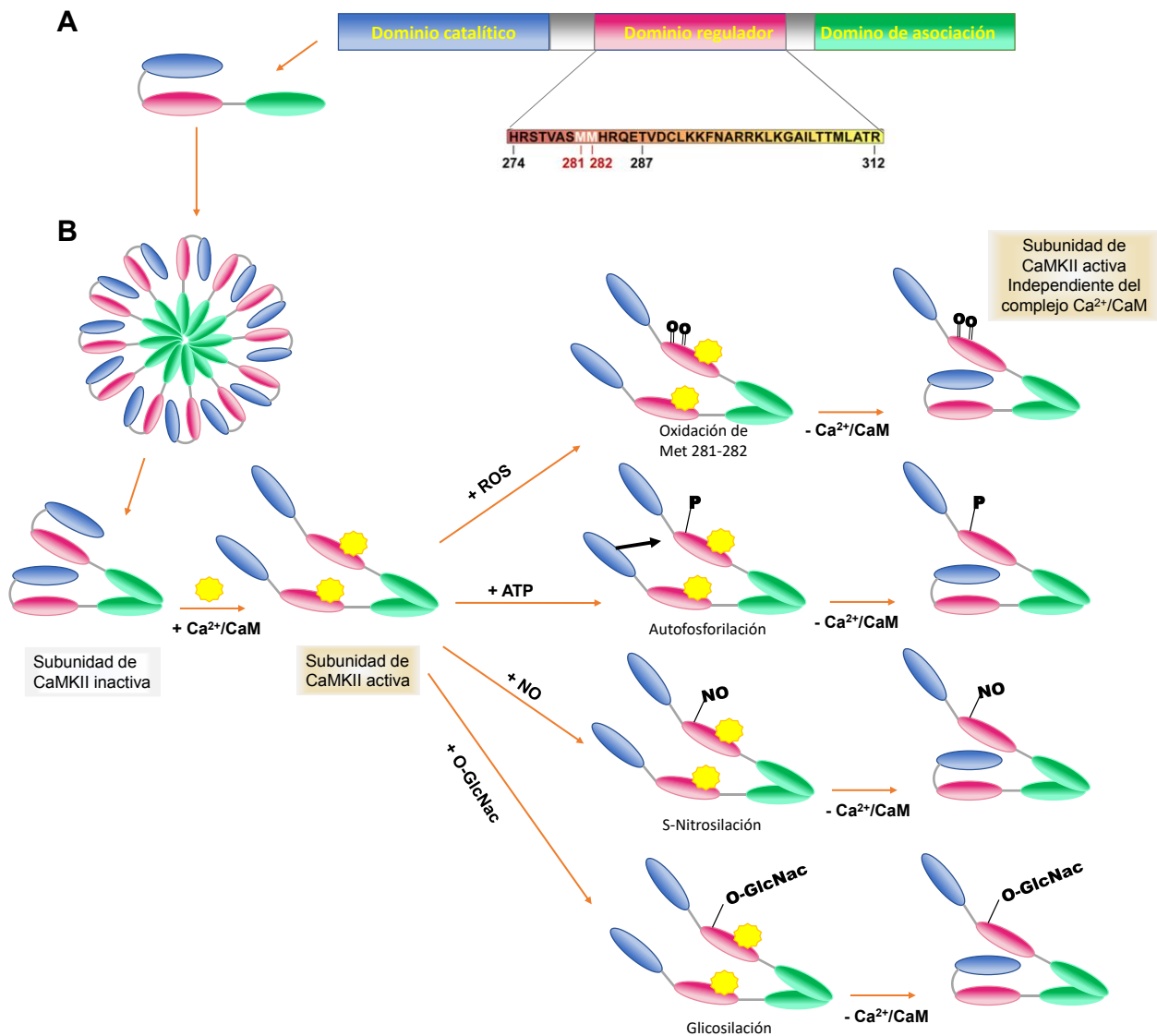


Figura 15. Estructura y activación de CaMKII: A) Esquema del monómero que muestra los dominios y el ensamblado de los mismos. Detalle de la secuencia aminoacídica del dominio regulador (274-312) donde se indican los sitios de oxidación 281 y 282 y de autofosforilación 287 (modificada de Erickson y col. 2008). B) Activación de la CaMKII por medio de su unión al complejo Ca^{2+} y CaM y modificaciones post-traduccionales que permiten a la enzima mantenerse activa en ausencia de niveles elevados de Ca^{2+} : la oxidación de las metioninas (Met) 281 y 282; la autofosforilación en la treonina 287; la S-Nitrosilación (sitio aún no identificado) y la O-N-acetilglicosilación (O-GlcNac) en Ser280 (Modificada de Erickson y col. 2014).

Una vez activada, CaMKII puede fosforilar numerosos sustratos tales como canales iónicos, bombas de transporte activo y factores de transcripción, entre otros (Bers y col. 2009). De esta manera regula, la electrofisiología, el manejo de Ca^{2+} , el AEC y la transcripción génica.

Los efectos de CaMKII sobre los canales iónicos del sarcolema y el impacto integrado de estos efectos en el PA son complejos (Bers y col. 2009). Por ejemplo, CaMKII tiende a aumentar la I_{Ca} y la corriente lenta de Na^+ por fosforilación del CCL y de los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Wagner y col. 2006), lo cual lleva a prolongar la duración del PA. Sin embargo, CaMKII puede también aumentar ciertas corrientes de K^+ que ejercen el efecto inverso (Mustroph y col. 2014). A nivel del RS, como ya se mencionó, CaMKII fosforila al RyR2 e incrementa la probabilidad de apertura del canal favoreciendo una mayor pérdida de Ca^{2+} . También fosforila a la PLN lo que aumenta la retoma de Ca^{2+} por desinhibición de la SERCA2a como se describió anteriormente.

Dado que CaMKII participa en múltiples procesos fisiológicos claves para el cardiomiocito, su actividad debe ser precisamente regulada. En los últimos años, varios trabajos han descrito que el aumento sostenido en la actividad de la CaMKII forma parte de los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan hipertrofia, apoptosis, disfunción contráctil, falla cardíaca y arritmias (Zhang y col. 2002 y 2003; Vila Petroff y col. 2007; Sag y col. 2009).

5. Injuria por isquemia y reperfusión

Cuando el aporte sanguíneo al miocardio es inadecuado o insuficiente se produce la isquemia. La falta de oxígeno y nutrientes genera alteraciones metabólicas que de persistir conducen a la muerte celular. La restauración del flujo sanguíneo (reperfusión) aparece entonces como esencial para prevenir el daño celular irreversible producido por la isquemia; pero paradójicamente la reperfusión puede exacerbar la injuria tisular. Este daño adicional se denomina “injuria por reperfusión” (Piper y col. 2003; García-Dorado y Piper 2006) y hace referencia a los efectos deletéreos que no fueron productos del período de isquemia y que se encuentran ligados al inicio del restablecimiento sanguíneo. Estos eventos adversos incluyen entre otros la aparición de arritmias, y el incremento de muerte celular.

En los últimos 40 años, estudios experimentales han permitido avances importantes en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia y reperfusión (I/R). Los efectos o alteraciones sobre la estructura y funcionalidad del corazón son diferentes dependiendo del tiempo de duración de la isquemia. Si se realiza una oclusión del flujo coronario, global o regional, durante un período muy breve, por ejemplo 5 min, cuando se restablece el flujo, el corazón recupera su función contráctil sin presentar daño tisular. Si este período de isquemia se extiende por más tiempo, entre 15-20 min dependiendo del animal, al restablecerse el flujo la función cardíaca se presenta disminuida aún sin existir daño tisular (Figura 16). A esta disfunción contráctil transitoria y reversible se la denomina *miocardio atontado* (en inglés: *stunning*, Heyndrickx y col. 1978; Braunwald y Kloner 1982). Si la isquemia se prolonga por más tiempo (por ejemplo más de 20 min en la rata), la reperfusión genera consecuencias dañinas irreversibles conduciendo a la muerte celular del tejido afectado (Bolli y Marbán 1999).

En este trabajo de Tesis utilizaremos como modelo experimental, el corazón atontado cuyos aspectos fisiopatológicos más relevantes describiremos en las próximas secciones.

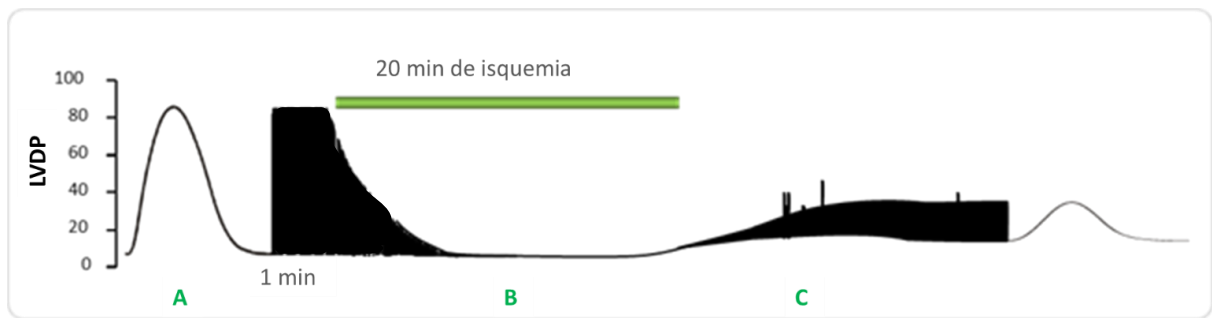


Figura 16. Recuperación mecánica de un corazón atontado. Registro representativo de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (LVDP) de un corazón perfundido de rata, sometido a un protocolo de atontamiento. A) Se muestra una onda expansiva durante el período de estabilización, (B) el período de isquemia sin actividad mecánica y (C) la depresión contráctil observada al inicio de la reperfusión.

5.1. Bases moleculares del atontamiento miocárdico

Si bien la patogénesis del miocardio atontado no está completamente establecida, se han propuesto dos hipótesis principales (Figura 17). Una de ellas plantea que el atontamiento es causado por un aumento en la producción de ROS/RNS al inicio de la reperfusión (Gardner y col. 1983; Myers y col. 1985) en tanto que la otra sostiene que el mecanismo causal sería la sobrecarga de Ca^{2+} que sufre el miocardio en este período (Gao y col. 1995). Estas dos hipótesis no son mutuamente excluyentes y pueden representar diferentes aspectos del mismo proceso fisiopatológico (Bolli y Marbán 1999).

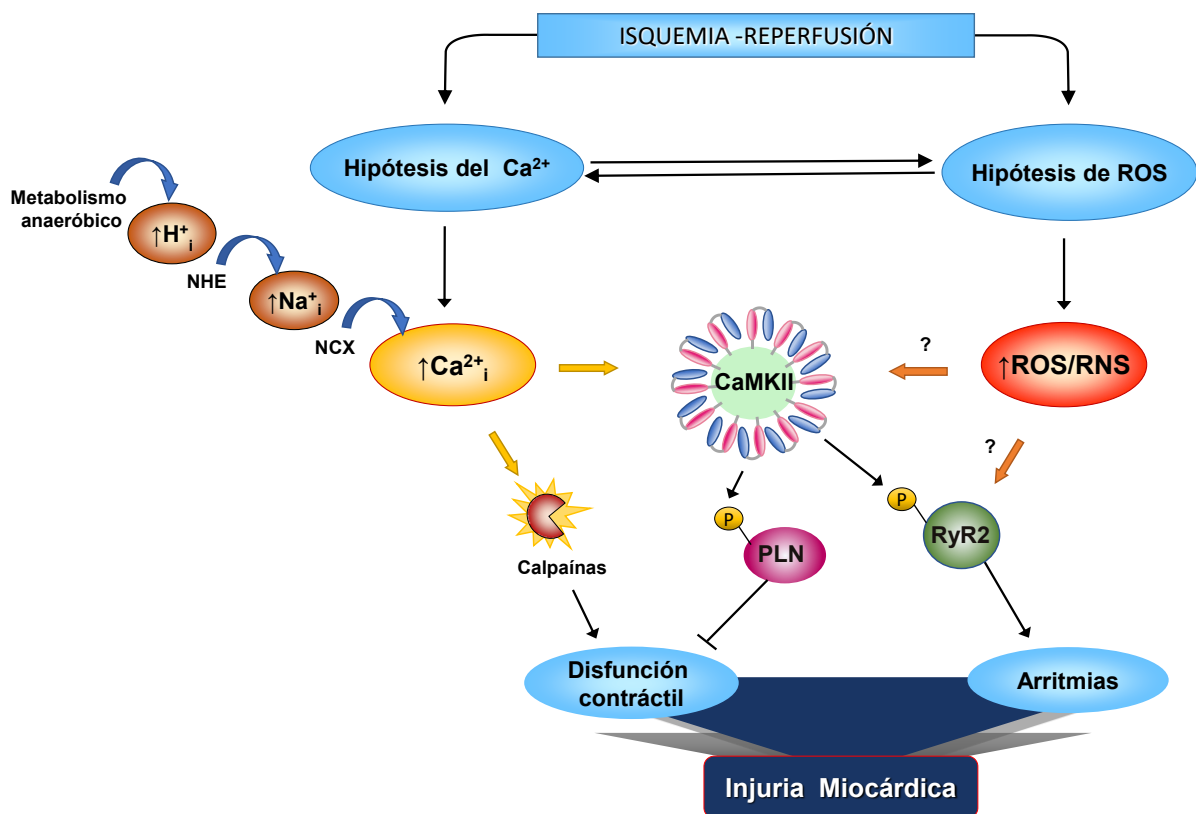


Figura 17. Esquema que describe la secuencia de eventos que conducen a la disfunción contráctil y la aparición de arritmias, características del atontamiento.

Desde principios de la década del '80 se viene estudiando la participación de los ROS/RNS en el atontamiento miocárdico. El uso de diferentes metodologías permitió detectar la producción de radicales libres en la reperfusión post-isquémica (Bolli y col. 1988; Zweier y col. 1989; Wang y col. 1996). Por otra parte, la recuperación de la función cardíaca en perros sometidos a isquemia regional de 15 min, mejoró con la administración de superóxido dismutasa (SOD) enzima que

cataliza la reacción de dismutación del radical $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 y de catalasa que transforma el H_2O_2 en O_2 y H_2O (Myers y col. 1985). Estos resultados pusieron en evidencia el rol fundamental de los ROS en el atontamiento. El mecanismo por el cual estas especies reactivas alterarían la función contráctil en el miocardio atontado, sería por su efecto directo sobre distintas biomoléculas (proteínas y lípidos), promoviendo su disfunción y afectando la integridad de las membranas.

Por otro lado, la hipótesis de la sobrecarga de Ca^{2+} fue estudiada principalmente en roedores. En ella se propone que el aumento de Ca^{2+} al inicio de la reperfusión se produce a causa del proceso de normalización del pH intracelular. Es el intercambiador Na^+/H^+ (NHE), que extruye H^+ en intercambio con Na^+ , el principal mecanismo que se encarga de revertir la acidosis generada durante la isquemia. El aumento de actividad del NHE conduce a un incremento en la concentración intracelular de Na^+ . Esto influye sobre la actividad del NCX el cual por dos mecanismos posibles, ya sea, disminuyendo el eflujo de Ca^{2+} (modo de acción "directo"), o aumentando su influjo (modo "reverso"), induce una sobrecarga citosólica de Ca^{2+} (Schäfer y col. 2001; Baczkó y col. 2003). Se ha sugerido que esta sobrecarga podría afectar la función contráctil por una proteólisis dependiente de Ca^{2+} mediada por la calpaína 1. Esta proteasa degrada a la troponina I de los miofilamentos y así disminuye la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles. En apoyo a esta secuencia de eventos, experimentos en roedores han demostrado que el Ca^{2+} intracelular retorna gradualmente a valores preisquémicos a pesar de persistir la disfunción contráctil, confirmando como asiento de la alteración a las proteínas sarcoméricas (Gao y col. 1995; Pérez y col. 1999; Valverde y col. 2006). Sin embargo, en mamíferos grandes el atontamiento miocárdico sí se acompaña de una disminución del transitorio de Ca^{2+} , con una I_{Ca} disminuida y un manejo de Ca^{2+} por el RS alterado (Thomas y col. 1999; Kim y col. 2001).

La sobrecarga de Ca^{2+} del inicio de la reperfusión también activa a otras enzimas dependientes de Ca^{2+} , como la CaMKII. Se demostró que la CaMKII desempeña un rol beneficioso en el corazón atontado, ya que a través de la fosforilación de PLN del RS conduce a un mejor manejo de Ca^{2+} y evita un mayor deterioro de la contractilidad durante la reperfusión (Said y col. 2003).

5.2. Arritmias de reperfusión

Una de las manifestaciones clínicas del daño por reperfusión es la aparición de arritmias cardíacas que, independientemente de la duración de la isquemia, pueden llegar a ser letales (Wit y col. 2001). De manera sencilla, puede definirse arritmia como cualquier cambio en el ritmo cardíaco que se aleje del ritmo sinusal normal. Estas variaciones pueden ser transitorias o sostenidas y de igual manera comprometer la función cardíaca.

Las arritmias cardíacas pueden surgir de anomalías en la propagación de los impulsos debido a bloqueos de conducción o reentradas, o alteraciones en la formación de los mismos, por aumento del automatismo o por descarga desde focos ectópicos (Zipes, 2003). Parte de las arritmias de reperfusión son debidas a esta última causa y se las conoce con el nombre de arritmias gatilladas (Carmeliet 1999; Lakireddy y col. 2006; Said y col. 2011). En este tipo de arritmias, un desbalance en las corrientes iónicas del miocito puede generar espontáneamente una corriente neta despolarizante que de alcanzar la magnitud umbral, desencadena un PA prematuro. Según su relación temporal con el PA generado por el ritmo sinusal se clasifican como: post-despolarizaciones tempranas o EADs (en inglés: *Early After Depolarizations*), aquellas que ocurren durante la fase 2 o 3 del PA; y post-despolarizaciones tardías o DADs (en inglés: *Delayed After Depolarizations*), las acontecidas luego de completada la repolarización (Priori y col. 1990; Clusin 2003). A nivel celular, la alteración en la homeostasis del Ca^{2+} parece tener una importancia fundamental en este tipo de arritmias. Se propone que las DADs son causadas por un incremento de las liberaciones espontáneas de Ca^{2+} desde el RS, que pueden desencadenar aumentos de Ca^{2+} globales y desincronizados que se autopropagan (ondas de Ca^{2+}) (Figura 18, resaltado en verde). Estos aumentos de Ca^{2+} activan al intercambiador NCX, que al introducir 3 Na^+ por cada Ca^{2+} extruído, genera una corriente despolarizante transitoria (Iti) potencialmente arritmogénica (Pogwizd 1998 y 2001). Las pérdidas espontáneas de Ca^{2+} del RS pueden ocurrir por dos mecanismos fundamentales: una sobrecarga de Ca^{2+} en la organela y/o una disfunción a nivel del RyR2, provocada por mutaciones o alteraciones post-traduccionales del canal (fosforilación y/o cambios redox) (Priori y col. 2001; Maier y col. 2003; Cutler y col. 2012).

Por otra parte, la generación de EADs, es facilitada por la prolongación del PA, ya que en este contexto puede haber una reactivación de la corriente de Ca^{2+} o de Na^+ cuando aún no se completó la repolarización como se observa en la Figura 18 resaltado en celeste (Clusin 2003).

Tanto EADs como DADs podrían estar favorecidas por la activación de CaMKII y posterior fosforilación de aquellos sustratos que participan en la generación de estas arritmias (CCL, canal de Na^+ , RyR2) (Anderson y col. 2007). Es interesante destacar que las arritmias gatilladas pueden desencadenar episodios arrítmicos de mayor gravedad como la taquicardia ventricular y la fibrilación ventricular (Clusin 2003).

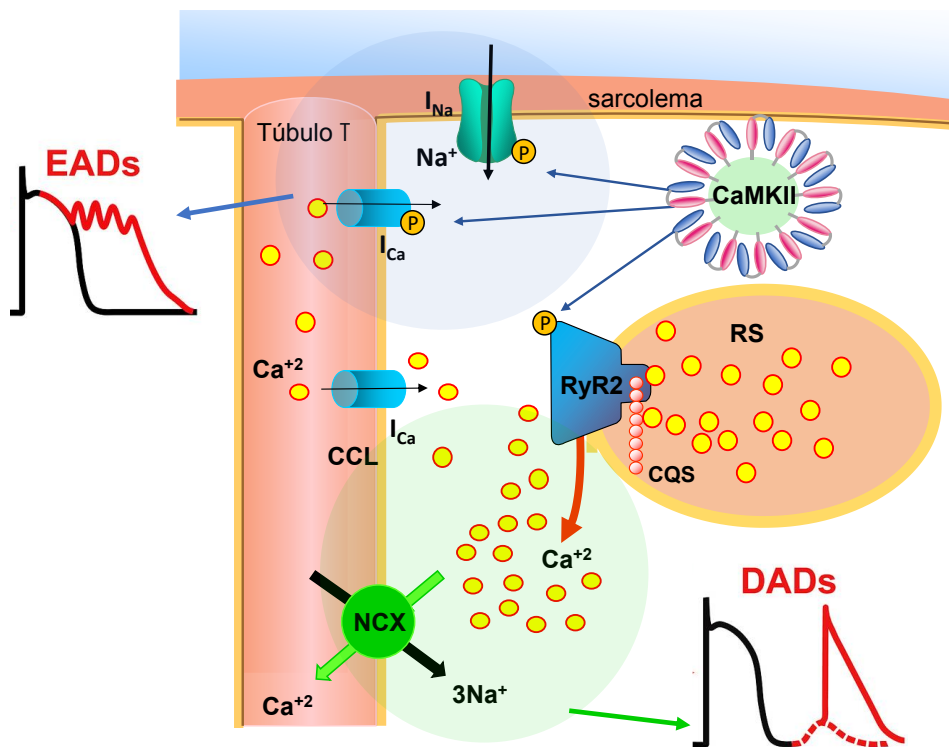


Figura 18. Mecanismos moleculares de post-despolarización tardía cardíaca. El esquema muestra cómo la activación de CaMKII puede desencadenar DADs. La fosforilación del RyR2 favorece la liberación diastólica de Ca^{2+} del RS, lo cual da como resultado la extrusión electrogénica de Ca^{2+} y la entrada de Na^+ por el NCX provocando así la despolarización de la membrana. Además, CaMKII puede generar EADs aumentando la I_{Ca} por fosforilación directa del CCL y/o aumentando la I_{Na} por fosforilación del canal de Na^+ . Modificada de Vincent y col. 2014.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron en un modelo de corazón perfundido de rata, que un gran porcentaje de las arritmias de reperfusión (70%) son dependientes del RS y gatilladas por DADs (Said y col. 2008 y 2011). Además se

observó que las arritmias disminuían significativamente tanto en los corazones de rata tratados con un inhibidor específico de la CaMKII (KN-93) como en los de ratones transgénicos carentes del sitio de fosforilación dependiente de CaMKII del RyR. En ambas especies, la inhibición de la fosforilación del RyR2 por CaMKII no anuló por completo las arritmias de reperfusión. Esto sugiere la existencia de otros mecanismos contribuyendo cooperativamente a estas alteraciones del ritmo (Said y col. 2011).

HIPÓTESIS

La hipótesis de este Trabajo de Tesis es que *las proteínas involucradas en el manejo del Ca^{2+} intracelular se oxidan durante la reperfusión postisquémica y estos cambios contribuyen a un desbalance del Ca^{2+} diastólico que lleva a la disfunción contráctil y la aparición de arritmias.*



OBJETIVOS



Objetivo General

El presente trabajo de tesis tuvo como finalidad profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de las alteraciones estructurales y funcionales resultantes de la injuria por isquemia y reperfusión miocárdica. Nos concentramos particularmente en el rol de los cambios redox que los ROS/RNS producen en las proteínas que manejan el Ca^{2+} intracelular evaluando su participación en la patogénesis de las arritmias.

Objetivos específicos

En un modelo experimental de corazón aislado sometido a I/R en ausencia y presencia de distintos agentes antioxidantes:

- Estudiar el estrés oxidativo.
- Detectar modificaciones redox sobre el RyR2.
- Relacionar las modificaciones redox halladas con la recuperación contráctil y la frecuencia, tipo y severidad de arritmias de reperfusión.
- Analizar la oxidación de la CaMKII y evaluar el impacto de esta modificación sobre su actividad enzimática.
- Investigar a través del uso de ratones transgénicos, carentes del sitio de fosforilación dependiente de CaMKII en el RyR2 (S2814A), el efecto de los antioxidantes sobre la generación de arritmias de reperfusión.

En miocitos aislados de ratones sometidos a I/R simulada:

- Evaluar la pérdida espontánea de Ca^{2+} desde el RS en presencia y ausencia de antioxidantes, como un indicador de la actividad del RyR2.

MATERIALES Y MÉTODOS



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

1. Animales

Los experimentos se realizaron en corazones de ratas macho (*especie Ratus Norvegicus*) de la cepa Wistar de 3-4 meses de edad (200-300g) y ratones machos (*especie Mus Musculus*) de la misma edad (25-30g). Las cepas de ratones que se utilizaron fueron: a) C57BL/6 silvestre y b) S2814A, ratones C57BL/6 knock-in que expresan una forma mutante del RyR2 en la cual se reemplazó el sitio fosforilable de CaMKII, serina 2814, por alanina, un aminoácido no fosforilable. La línea de ratones S2814A fue inicialmente provista por el Dr. Xander Wehrens, de la Universidad de Houston, Texas, EE.UU (Chelu y col. 2009) y luego continuada en el bioterio de nuestra facultad. Los ratones utilizados fueron previamente tipificados por la técnica de PCR.

2. Perfusión de corazones

Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de Ketamina y Diazepam (70 y 5mg/kg, para rata) (100 y 5mg/kg, para ratón). La dosis fue suficiente para producir un plano quirúrgico de anestesia (verificado por la pérdida del reflejo podal de retirada y/o del reflejo corneal).

Luego de la toracotomía, se canuló la aorta y el corazón aislado fue rápidamente perfundido por la técnica de Langendorff (Figura 19). La temperatura (37°C) y el flujo coronario se mantuvieron constantes (12-14ml/min, rata; 2-4ml/min, ratón) hasta alcanzar una presión de perfusión coronaria entre 80 y 100mmHg. Posteriormente se ablacionó el nódulo aurículo-ventricular, y se fijó la frecuencia cardíaca (4Hz, rata; 6 Hz, ratón) mediante electrodos colocados en el ventrículo derecho. La solución utilizada para perfundir los corazones de rata contenía (en mM): 128,3 NaCl; 4,7 KCl; 1,35 CaCl₂; 20,2 NaHCO₃; 0,4 NaH₂PO₄; 1,1 MgSO₄; 11,1 glucosa y 0,04 Na₂EDTA. La solución de perfusión para el ratón fue idéntica, excepto

que se usó 2,5mM CaCl₂. Las soluciones se equilibraron con 95% O₂ -5% de CO₂ hasta lograr un pH de 7,4 (Vittone y col. 2002).

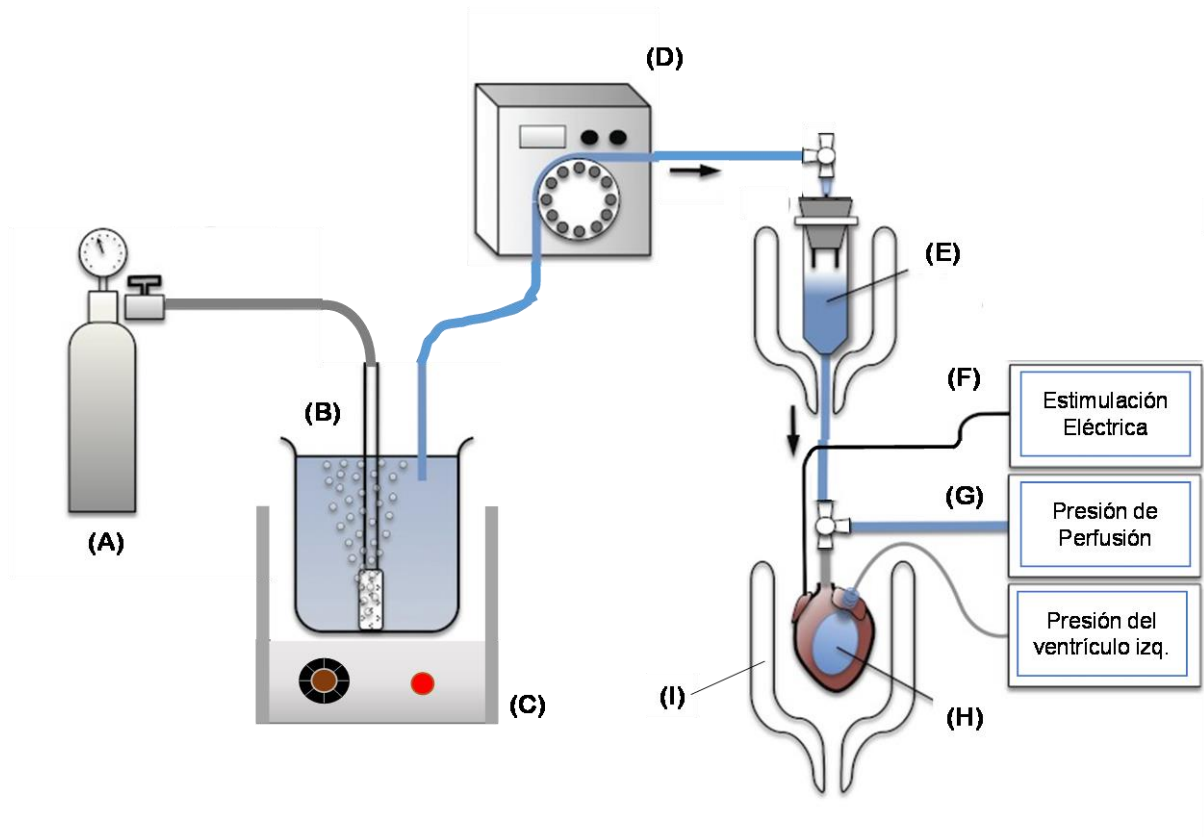


Figura 19. Esquema del equipo de Langendorff: A) Tubo de carbógeno (mezcla de 95% O₂ y 5% N₂). B) Erlenmeyer con la solución de perfusión. C) Baño termostático. D) Bomba peristáltica. E) Equipo de perfusión termostatzado a 37°. F) Electrodos de estimulación. G) Conexión para medir la presión de perfusión. H) Transductor conectado a un balón intraventricular que permite la medida de parámetros mecánicos del ventrículo izquierdo. I) Cámara de isquemia. Figura modificada de Liao y col. 2012.

2.1. Medidas mecánicas

La actividad mecánica de los corazones se registró digitalmente, mediante la introducción en el ventrículo izquierdo (VI) de un balón de látex conectado a un transductor presión (AD Instruments MLT 0380, CO, EE.UU.). El balón se llenó con solución acuosa hasta conseguir una presión diastólica final (LVEDP) de aproximadamente 5-10 mmHg. La contractilidad se evaluó midiendo la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (LVDP) y su primera derivada (+dP/dt).

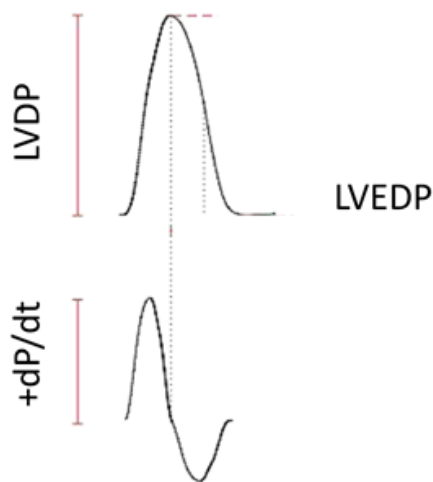


Figura 20. Trazo representativo donde se indican los parámetros contráctiles evaluados durante el protocolo experimental: presión intraventricular izquierda (LVDP), su primera derivada (+dP/dt) y presión diastólica final (LVEDP).

2.2. Medidas eléctricas

Simultáneamente con las medidas mecánicas se registraron potenciales de acción monofásicos (MAPs) que se obtuvieron usando un electrodo de Ag/AgCl, apoyado sobre la superficie epicárdica de la pared del libre del VI. Aunque las medidas de MAPs son locales, estos eventos eléctricos se asociaron la mayoría de las veces con cambios mecánicos medidos en todo el ventrículo. El registro de MAPs permitió la cuantificación de extrasístoles o latidos ventriculares prematuros (LPs), episodios de taquicardia ventricular (TV) y fibrilación ventricular. Los LPs y los episodios de TV fueron estudiados durante los primeros 3 min de reperfusión, (Said y col. 2008), momento en el que se observa el mayor número de arritmias.

La utilización del corazón perfundido como modelo experimental, tiene la ventaja de conservar los distintos tipos celulares presentes en el corazón, permitiendo mantener el acople intercelular y aportando información fisiológica relevante sobre la

inducción y propagación de las arritmias, lo que no es posible usando células aisladas.

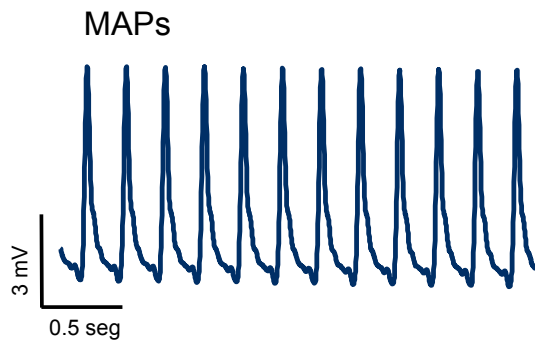


Figura 21. Registro de potenciales de acción monofásicos epicárdicos obtenidos en el corazón de rata (MAPs).

2.3. Protocolos experimentales

Controles (C)

Los corazones usados como controles fueron estabilizados y perfundidos durante un período idéntico al del protocolo de isquemia-reperfusión.

Isquemia/Reperfusión (I/R)

Luego de su estabilización mecánica los corazones fueron perfundidos durante 10 min (Ctrl) sometiéndolos a continuación, a la interrupción total del flujo coronario (Isquemia, I) durante un período de 20 min (para rata) y de 15 min (para ratón). En este lapso el corazón dejó de ser estimulado eléctricamente y se mantuvo sumergido en una cámara termostatzada a 37°C (Figura 19). Finalizada la isquemia, se restauró la perfusión coronaria (Reperfusión, R) por 30 min. A distintos tiempos durante la perfusión, los corazones fueron congelados en N₂ líquido y almacenados a -80° hasta el momento de las determinaciones bioquímicas.

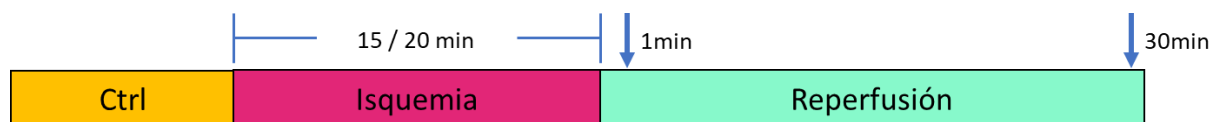


Figura 22. Protocolo experimental de I/R: las flechas indican los tiempos a los cuales los corazones fueron congelados para las determinaciones bioquímicas.

Intervenciones durante la I/R

Cuando el protocolo de I/R se realizó en presencia de los distintos inhibidores farmacológicos o atrapadores de ROS/RNS, estos fueron perfundidos 10 min previos a la isquemia y mantenidos durante todo el protocolo.

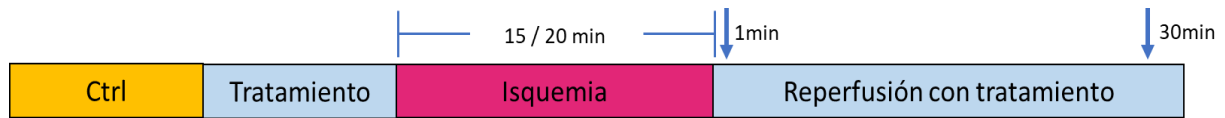
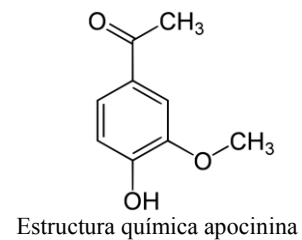


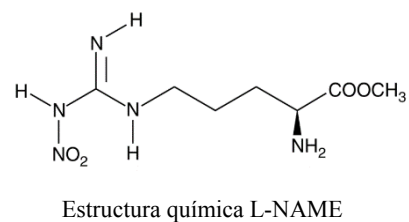
Figura 23. Protocolo experimental de I/R en presencia de inhibidores o atrapadores. Las flechas indican los tiempos a los cuales los corazones fueron congelados para las determinaciones bioquímicas.

Las drogas utilizadas fueron:

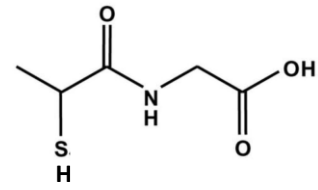
Apocinina (4'-Hidroxi-3'-metoxiacetofenona, APO). Es un compuesto orgánico que bloquea la actividad de la NADPH oxidasa (NOX) ya que impide la translocación de dos de sus subunidades p47phox y p67phox desde el citoplasma a la membrana, evitando de esta manera el ensamblado y activación de la enzima (Stefanska y Pawliczak 2008). Se perfundió en los corazones en una concentración de 10 μ M (Donoso y col. 2014).



L-N^G-Nitroarginina metil éster (L-NAME). Es un inhibidor constitutivo de las diferentes isoformas de las óxido nítrico sintetasas (NOS), enzimas productoras de NO. El L-NAME es una droga inactiva en sangre y plasma. Al ingresar a las células al ser hidrolizado por esterasas se convierte en un compuesto activo e inhibe a las NOS (Mayer, 1996). Se utilizó en los corazones perfundidos en una concentración de 100 μ M (Inserte y col. 2013).

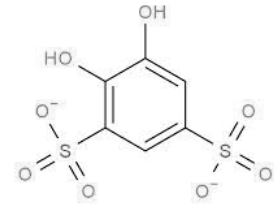


N-(2-mercaptopropionil) glicina (MPG). Es un atrapador del radical hidroxilo. Compuesto capaz de permear la membrana y quelar radicales libres (Tanonaka y col. 2003). Se utilizó en una concentración de 2mM (Fantinelli y col. 2013).



Estructura química MPG

Ácido 4,5-dihidroxi 1,3-bencenodisulfónico (Tiron). Es un atrapador selectivo del anión superóxido, con el que reacciona para formar H₂O₂ y Tiron-semiquinona, (Fatai y Taiwo 2008). Su pequeño tamaño le facilita la entrada a la célula. Se utilizó en una concentración de 100µM (Koyama y col. 2013).



Estructura química de Tiron

3. Determinaciones bioquímicas

3.1 Obtención de homogenatos:

Homogenatos en condiciones reductoras: 200mg de tejido ventricular congelado fueron homogeneizados en 4 volúmenes de buffer de lisis compuesto por: 20mM Tris, 300mM sacarosa, 25mM NaF, 5mM EDTA, 2,5mM EGTA, 1% Igepal, 0,1% SDS, 1mM PMSF, 2mM benzamidina, 10µg/µl leupeptina y 1µg/µl pepstatina, pH: 7,4. Se utilizó vástago de teflón en dos ciclos de 15 pasadas. Las muestras fueron trasvasadas a tubos Eppendorff para ser centrifugadas por 10 min a 13.000xg. Los pellet fueron descartados y se utilizaron los sobrenadantes para el análisis bioquímico. Todo el procedimiento se realizó a 4°C. La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratorios, Inc. USA), usando albúmina bovina como estándar.

Homogenatos en condiciones no reductoras: 200 mg de tejido fueron homogeneizados utilizando el mismo buffer que se usó en condiciones reductoras, pero ahora en presencia de 25mM N-etilmaleimida (NEM), un agente alquilante de los grupos sulfhidrilos (-SH), que permite mantener el estado redox de la muestra (Hill Bradford y col. 2010). El bloqueo inmediato de las cisteínas reducidas es muy importante para minimizar la posibilidad de que se puedan oxidar durante el procesamiento de las muestras (Figura 24). El resto del aislamiento fue realizado de la misma manera que en los homogenatos reductores.

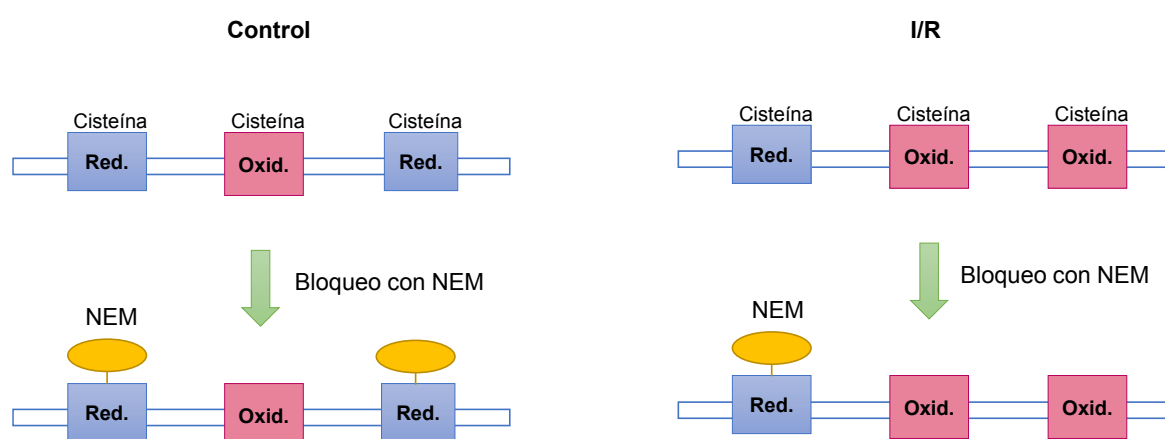


Figura 24. Esquema que muestra el estado de las cisteínas en los distintos protocolos experimentales: el agregado de NEM al homogenato bloquea a los tioles libres, preservando el estado de las cisteínas al finalizar cada experimento, evitando que se oxiden como producto del procesamiento de las muestras.

3.2. Aislamiento de vesículas de Retículo Sarcoplasmático (RS)

El aislamiento de esta fracción sub-celular fue llevado a cabo por centrifugación diferencial según se describe en Mundiña-Weilenmann y col. (1996).

Se utilizaron los medios que se describen en la siguiente tabla:

Medio 1		Medio 2		Medio 3	
Reactivos	Con. Final	Reactivos	Con. Final	Reactivos	Con. Final
PO ₄ H ₂ K	30mM	PO ₄ H ₂ K	30mM	Histidina	30mM
NaF	25mM	NaF	10mM	Sacarosa	0,25M
Sacarosa	0,3M	KCl	0,6M	O.A.	1uM
EDTA	10mM	EDTA	10mM	EDTA	10mM
PMSF	1mM	PMSF	1mM	PMSF	1mM
Benzamidina	1mM	Benzamidina	1mM	Benzamidina	1mM
Leupeptina	2ug/ml	Leupeptina	4ug/ml	Leupeptina	4ug/ml
Pepstatina	1ug/ml	Pepstatina	1ug/ml	Pepstatina	1ug/ml
Inhib. de proteasas	2X	Inhib. de proteasas	2X	Inhib. de proteasas	2X
NEM	25mM	NEM	25mM	NEM	25mM

Se tomaron 800mg de tejido cardíaco pulverizado y se resuspendieron en 4 volúmenes de medio 1 (M1) para ser homogenizados (Polytron). Se hicieron 4 pasadas de 15 segundos a una velocidad de 8 con intervalos de 30 segundos (dentro de un recipiente con hielo). Las muestras fueron luego trasvasadas y centrifugadas a 5.200xg por 20 min. El sobrenadante (SN) fue reservado en la heladera, mientras que el pellet obtenido se resuspendió en 2 volúmenes de M1, se realizaron 2 pasadas con Polytron de 10 segundos con intervalos de descanso de 30 segundos y se centrifugó a 5200xg durante 20 min. Luego se procedió a la combinación de los dos SN, reservándose una fracción como "homogenato" y el resto se centrifugó a 16.300xg durante 20 min. El SN fue vuelto a centrifugar a 46.800xg por 45 min. En esta nueva centrifugación el SN fue descartado, mientras que el pellet obtenido fue resuspendido en 3 volúmenes del medio 2 (M2) con ayuda de un vástago de teflón y vórtex. Se llevó nuevamente a centrifugar a 46.800xg por 45 min; el SN con las miofibrillas restantes se descartó y el pellet conteniendo las vesículas de RS fue solubilizado en pequeños volúmenes de medio 3 (M3). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización. En la Figura 25 se esquematiza el protocolo descrito previamente.

Homogeneización en 4 volúmenes de MEDIO 1
4 pasadas de 10 seg. (intervalo de 30 seg. entre c/u)
Polytron veloc 8
Centrifug **5200 xg 20 min**

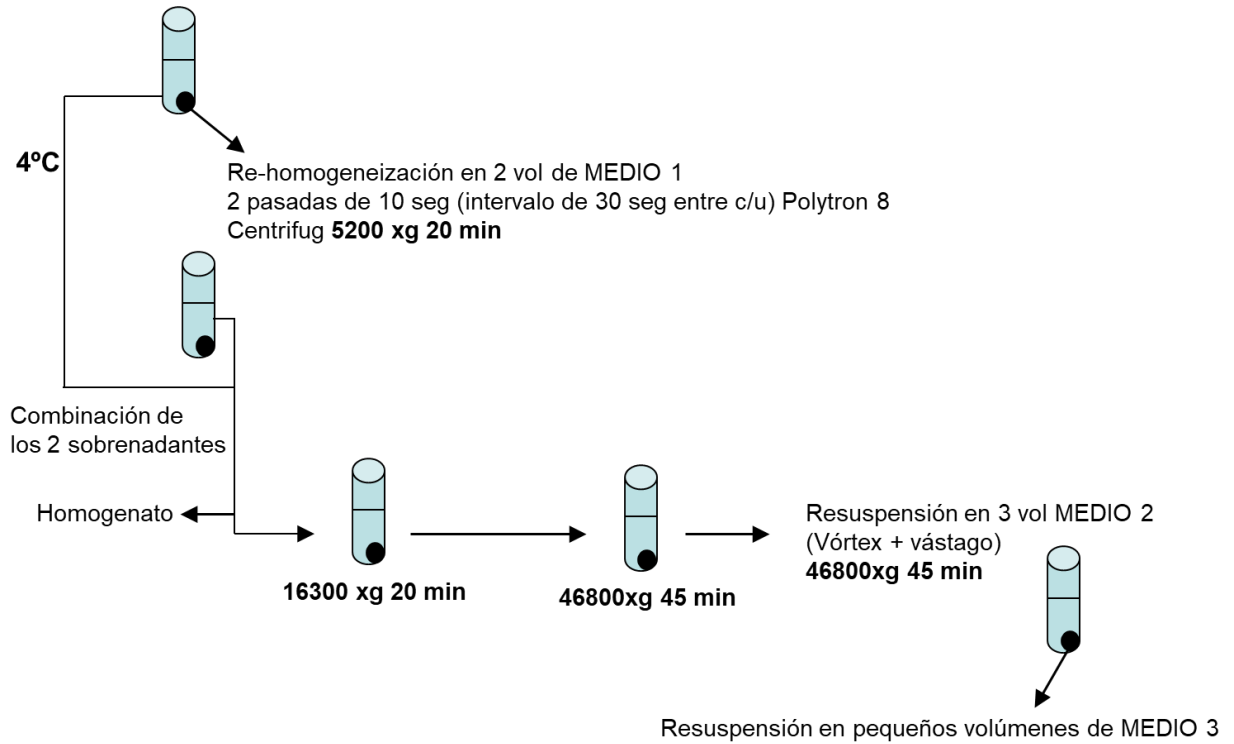


Figura 25. Esquema del protocolo empleado para aislamiento de vesículas de RS.

3.3. Inmunodetección por Western blot

Técnicas electroforéticas para detección de proteínas

Las proteínas contenidas en la muestra a sembrar fueron disueltas en la correspondiente solución solubilizante reductora (buffer de carga Laemmli: 60mM Tris-Cl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% β -mercaptoethanol; 0,01% bromophenol blue), para ser separadas electroforéticamente. Se utilizaron geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS) de acuerdo a la técnica de Laemmli (Laemmli 1970) o a la técnica de Porzio y Pearson (modificación de la anterior) (Porzio y Pearson 1977). El porcentaje de acrilamida utilizado fue acorde al peso molecular de la proteína en estudio. El gel de apilamiento se preparó según la siguiente composición: 3 y 4% acrilamida (relación acrilamida/N, N'-metilenbisacrilamida 30:0,8 según la técnica de Laemmli y 30:1 según la técnica de Porzio y Pearson), 125mM Tris-HCl (pH: 6,8) y 0,1% SDS. El gel de resolución preparado siguiendo el método de Laemmli fue utilizado para separar RyR2. Se elaboraron geles en gradiente 3,5-8% acrilamida, 375mM Tris (pH 8,7) y 0,1% SDS. El gel de resolución preparado siguiendo el método de Porzio y Pearson contuvo: 8 y 10% acrilamida (en el porcentaje que correspondiera en cada caso), 400mM (3:1) Tris/glicina (pH 8,8), 5% glicerol, 0,1% SDS y 0,2mM Na₂EDTA. La polimerización del gel fue catalizada en todos los casos por el agregado de 0,08% tetrametilendiamina (TEMED) y se inició por el agregado de 10% de persulfato de amonio. El buffer de electroforesis empleado contuvo: 25mM Tris, 192mM glicina y 0,1% SDS (pH 8,3).

La cantidad de proteína sembrada en cada gel fue: 50 μ g para la detección de PLN (proteína total y forma fosforilada), GAPDH, para pThr286-CaMKII y CQS; 100 μ g para pSer2815-RyR2 y RyR2 total.

La electroforesis se realizó a voltaje (V) constante, iniciándose a 80V para el apilamiento de las muestras y llevándose a 120V para la separación de las proteínas en el gel entero. Transcurrido el tiempo los geles se lavaron con el buffer de transferencia: 25mM Tris, 192mM glicina, 10% metanol, a fin de eliminar la mayor cantidad de SDS posible. Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF) (Immobilon-P, Millipore, USA) por la técnica de transferencia húmeda durante 1hs a 60V constante (para proteínas de bajo peso molecular) y 15 hs a 25V y sin metanol (proteínas de alto peso molecular). Las membranas luego de ser transferidas, fueron incubadas durante 1 hora a

temperatura ambiente con solución de TBS o TBS-T suplementada al 5% con leche descremada con el objeto de bloquear los sitios libres de proteínas en la membrana, y así evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la superficie de la misma. Para la detección inmunológica de las proteínas de interés, las membranas ya bloqueadas fueron incubadas con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos primarios y las diluciones utilizadas fueron: pThr17-PLN (Badrilla, Leeds, UK, 1:2500 en TBS-5% leche), PLN total (Thermo Fisher Scientific, 1:5000 en TBS-1% leche); pSer2815-RyR2 (Badrilla, Leeds, UK, 1:5000 en TBST-1% leche) RyR2 (Affinity BioReagents, 1:2000 en TBST-5% leche); GAPDH (Millipore, 1:10,000 en TBST-1% leche) calsequestrina (Thermo Fisher Scientific, 1:5000 en TBS-1% leche), pThr286-CaMKII (Abcam, 1:1000 en TBST-1% albúmina).

Al día siguiente el anticuerpo fue retirado y las membranas fueron lavadas 3 veces durante 30 min con TBS o TBS-T. Finalmente, las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con anticuerpos secundarios específicos conjugados a la peroxidasa de rabanito (Santa Cruz; 1:10000 en TBS-T 1% leche). El revelado fue realizado con reactivos quimioluminiscentes (ECL, Amersham) y la señal fue recogida por un sistema de alta sensibilidad de detección (ChemiDoc™ XRS). La intensidad de la señal fue cuantificada analizando la imagen digitalizada con el programa ImageJ (1.37v NIH, USA).

DetECCIÓN DEL ESTADO REDOX

La determinación del estado redox de CaMKII (oxidación en las Met 281 y 282 CaMKII-ox) y RyR2 (S-glutacionilación y S-nitrosilación), fue llevada a cabo en homogenatos o en vesículas de RS en condiciones no reductoras.

► **CaMKIIox:** El estudio de las oxidaciones de las metioninas 281 y 282 de CaMKII se llevó a cabo disolviendo 50µg de proteínas de homogenato en buffer de carga no reductor (60mM Tris-Cl pH 6,8; 2%SDS; 10%glycerol, 0,01% azul de bromofenol y 25mM NEM) y calentándola 5 min a 95°C. Las proteínas fueron separadas en geles SDS de acuerdo la técnica de Porzio y Pearson y transferidas como se describió anteriormente. Luego de bloquear la membrana por 1 h con TBS-T 0,1% suplementada al 5% con leche descremada, se incubo con anticuerpo primario (Millipore, 1:1000 en TBS-T 5% Leche) toda la noche a 4°C con agitación. Una vez

retirado el anticuerpo, se lavó 3 veces con TBST por 30 min y se incubó con anticuerpo secundario de conejo conjugado a la peroxidasa de rabanita (Santa Cruz Biotechnology, 1:10000 1% leche TBST) y revelado como antes descrito.

► **RyR2:** Para la detección de las modificaciones redox: S-Glutationilación y S-Nitrosilación de RyR2, 50 µg de proteína del homogenato se resuspendieron en solución de carga no-reductora conteniendo: 4M urea; 2% SDS; 8,7% glicerol; 0,5mM EDTA; 167,5mM Tris (pH: 8,5) y 35mM NEM. Las muestras con el buffer de carga se calentaron por 20 min a 50°C. Posteriormente se separaron en geles en gradiente de poliacrilamida del 3,5-8 % en condiciones no reductoras (Sánchez y col. 2005). La electroforesis se realizó a voltaje constante, 120V, utilizando como buffer de corrida 50mM Tris, 50mM Tricina y 3,5mM SDS. La electroforesis culminó una vez pasada una hora de que el frente de la corrida haya caído (debido al peso del monómero del receptor de rianodina, nos aseguramos su correcta entrada y separación). Se realizó transferencia húmeda de los geles a membranas PVDF a amperaje constante (0,37 A) durante dos horas, utilizando como buffer de transferencia 12,5mM Tricina; 12,5mM Bis-Tris Propano; 1mM EDTA y 10% Metanol. Las membranas se bloquearon con buffer TBS-5% albúmina (Sigma) o leche y 0,2% Tween durante toda la noche. Se incubaron con los anticuerpos primarios en dilución 1:1000 durante 4 hs a 37°C y en oscuridad, en TBS-T 0,2%, 5% albúmina para anti-glutación (anti-GSH, Virogen) y para anti-nitrosocisteína (anti-SNO, AG Scientific Inc.). Finalmente las membranas fueron lavadas 4 veces con TBS-T 0,2% durante un período de 35 min, para luego ser incubadas con el anticuerpo secundario específicos conjugados a la peroxidasa de rabanita anti- RyR2 (Santa Cruz Biotechnology, 1:10000 5% BSA TBS-T) y revelado como antes descrito.

Los resultados fueron expresados normalizando la señal densitométrica por la obtenida de RyR2.

3.4. Contenido de sulfhidrilos libres de RyR2

El contenido de tioles libres en RyR2 se determinó a través de un método de fluorescencia utilizando el compuesto monobromobimane (mBB, Calbiochem).

El tejido proveniente de VI congelado, se homogeneizó al cuidado de la luz y en cinco volúmenes de buffer HEN conteniendo: 250mM Hepes (pH 7,4); 1mM

EDTA; 50mM neocupreína; 300mM sacarosa e inhibidores de proteasa (0,5 mg/ml leupeptina; 1mg/ml pepstatina; 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1mM benzamidina y cóctel inhibidor de proteasa (ROCHE). Los homogeneizados se centrifugaron a 12.000x g durante 10 min y los sobrenadantes de cada muestra se separaron en tres, una parte se incubó con NEM 4mM (agente alquilante de los grupos tiol), otra con ditioneitol 10mM (DTT, agente reductor) y una fracción no tratada. Se dejaron en oscuridad durante 30 min y a temperatura ambiente, luego las muestras se centrifugaron a 40.000x g durante 1 h y los pellets se lavaron cuidadosamente y se resuspendieron en tampón HEN. El tratamiento con DTT y NEM se utilizó para obtener valores máximos y mínimos de fluorescencia de mBB, respectivamente, evidenciando de esta manera la cantidad de sulfhidrilos totales expuestos y la fluorescencia inespecífica que se une a cada muestra. Posteriormente se incubaron con 5mM mBB durante 1 h en la oscuridad ya temperatura ambiente. Para eliminar el mBB no unido, las muestras se centrifugaron a 40.000 g durante 1h, y las vesículas se lavaron y se resuspendieron en tampón HEN. Se solubilizaron en buffer de carga SDS5X no reductor con una concentración final de NEM 2mM. Las muestras se calentaron durante 20 min a 50°C, y las proteínas se separaron en geles en gradiente (3.5-8%) de Tris-acetato en condiciones no reductoras (descritos anteriormente). Las imágenes se adquirieron utilizando el sistema de imagen Chemidoc (Bio-Rad) y se analizaron con el software ImageJ (NIH). La fluorescencia de mBB se normalizó con la cantidad de RyR2 determinada de la tinción con azul de Coomassie de los geles (Terentyev y col. 2008). Además el tratamiento con agentes reductores (DTT) y bloqueantes de grupos tioles (NEM) se utilizó para obtener valores máximos y mínimos de fluorescencia de mBB como se explicó anteriormente.

3.5. Medida de glutatión reducido (GSH)

La medida de glutatión reducido se utilizó como índice de estrés celular. El contenido total de GSH se determinó siguiendo el método descrito por Ellman's (Sedlak y col. 1968). Para ello el tejido ventricular pulverizado se trató con cuatro volúmenes de ácido tricarbóxico (TCA) al 10%, se incubó en un baño de agua con hielo durante 20 min y después se sedimentaron las muestras a 8500xg durante 15 min. El pellet se descartó y el sobrenadante fue utilizado para la determinación de

los niveles de GSH. El método se basa en la reacción de grupos sulfhidrilo no proteicos con ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (0,01M) en un tampón 0,4M Tris, a pH: 8,9 para dar un compuesto que absorbe a 412 nm. Los niveles de GSH se expresaron en microgramos por gramo de tejido de corazón.

3.6. Detección de ROS

La generación de ROS se determinó usando el método de fluorescencia dihidroethidium (DHE, Sigma). El DHE en sí mismo emite fluorescencia azul en las células ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$: 355/420nm), mientras que la forma oxidada del etidio emite fluorescencia roja cuando se intercala en el ADN ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$: 518/605 nm.).

Para llevar a cabo el ensayo se utilizaron cortes de VI, que se congelaron en Tissue Tec a la temperatura óptima de corte (Sakura Finetek Europe). Con el uso de un criostato (Leica), se cortaron secciones transversales de 20 μ m, se montaron en portaobjetos (Pearl) y se incubaron con DHE 10 μ M a 37°C durante 30 min en una cámara protegida de la luz y humidificada. Las secciones se lavaron dos veces con buffer fosfato y se almacenaron en la oscuridad. Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E200) con filtro de rodamina. La intensidad de fluorescencia por imagen se cuantificó utilizando el software de análisis ImageJ (NIH). Se analizaron cinco secciones cardiacas congeladas por animal y se tomaron 20 fotografías, aleatoriamente para cada sección, con un objetivo de 40X (Mital y col. 2011).

3.7. Medida de actividad de la NADPH Oxidasa (NOX)

La actividad de la NOX se determinó midiendo la producción de superóxido a través de una reacción de quimioluminiscencia con lucigenina en vesículas RS. Las fracciones enriquecidas en vesículas RS se obtuvieron a partir de corazones congelados que fueron homogeneizados en cuatro volúmenes de MOPS-Tris 20 mM (pH 6,8) y sacarosa 300mM con inhibidores de proteasa (4 μ g/ml de leupeptina, 4 μ g/ml de pepstatina, 1mM benzamidina, y 1mM PMSF). El homogeneizado se centrifugó a 3800xg durante 15 min, y el pellet resultante se rehomogeneizó y sedimentó a la misma velocidad. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se combinaron y centrifugaron a 28000xg durante 15 min. El sobrenadante resultante se centrifugó a 120000xg durante 1 h después de la adición de KCl sólido a una

concentración final de 0,65 M. El pellet se resuspendió a 10mg de proteína/ml en tampón de homogeneización. Se incubaron vesículas RS (0,2mg/ml) en MOPS-Tris 100mM (pH: 7,0), 100 μ M NADPH y 5 μ M lucigenina a 25°C. La quimioluminiscencia se midió en un luminómetro Berthold FB 12 y se expresó como nanomoles de anión superóxido por miligramo de proteína por min (Sánchez y col. 2008).

4. Aislamiento de cardiomiocitos

Los miocitos cardíacos de ratón, fueron aislados según la técnica de digestión enzimática en un sistema de perfusión tipo Langendorff descrita previamente (Villa Petroff y col. 2007). Una vez anestesiado el animal el corazón se removió y se colocó en un sistema de perfusión tipo Langerdorff mediante canulación de la aorta.

El corazón se perfundió retrógradamente a 37°C con solución HEPES pH 7,4 (en mM: 146,2 ClNa; 4,7 ClK; 10 ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES); 0,35PO₄NaH₂; 1,05 SO₄Mg; 10 glucosa) 1mM Cl₂Ca burbujeada con O₂ al 100 %. Luego, el corazón se perfundió durante 5 min con una solución HEPES libre de Ca²⁺ dado que contiene 0,1mM de EGTA (compuesto capaz de unirse al Ca²⁺ libre y quelarlo), con lo cual el corazón deja de latir y se debilitan las uniones intercelulares.

El siguiente paso consistió en recircular, durante 15 min aproximadamente, una solución de digestión compuesta por una solución HEPES con los siguientes agregados: 0,5 mM Cl₂Ca; 0,5 mg/ml colagenasa tipo II (200U/ml), 0,02mg/ml proteasa y 0,5 mg/ml albúmina bovina. El proceso de digestión se realizó a 37°C, y en su etapa final se pudo observar una menor consistencia del corazón al tacto.

Una vez concluida la digestión, el corazón se desmontó y el tejido ventricular se disoció mecánicamente con tijera. De esta forma se obtuvo una suspensión de células que atravesaron 4 pasos de decantación y resuspensión en soluciones HEPES cada vez más concentradas de Cl₂Ca, hasta lograr una concentración final de 1,8 mM. Este pasaje escalonado por soluciones progresivamente más concentradas en Cl₂Ca tiene como finalidad evitar la muerte celular por recalcificación rápida. Finalmente, las células aisladas fueron conservadas a 20-24°C, donde se mantuvieron en suspensión hasta su utilización. Los miocitos cardíacos fueron elegidos para su estudio en base a su morfología (patrón sarcomérico conservado y bordes regulares (Figura 26), a su capacidad de

contraerse ante la estimulación eléctrica y a la ausencia de contracciones espontáneas.

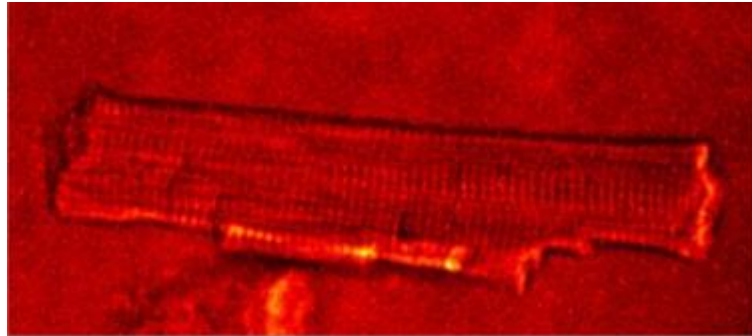


Figura 26. Imagen de campo claro de un miocito cardíaco. Puede observarse un patrón sarcomérico conservado y bordes regulares de la célula.

4.1. Medida de pérdida espontánea de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático mediante microscopía confocal (*sparks*)

Los miocitos aislados se incubaron con $20\mu\text{M}$ del indicador fluorescente de calcio, Fluo-4 AM (Molecular Probes), durante 20 min en oscuridad. Al finalizar este período, los miocitos se lavaron con solución Hepes para permitir la desesterificación del indicador.

Las células cargadas se dejaron reposar durante 5 min en una cámara conectada a un microscopio invertido Zeiss 410 (LSM, Tech, Pennsylvania, USA). Se sub-perfundieron a $1\text{ml}/\text{min}$ con la solución HEPES y se estimularon por campo a través de electrodos adheridos a la cámara a una frecuencia de 1Hz . El indicador fue excitado por un láser Argón a 488 nm y la emisión fue colectada en un rango entre $510\text{-}530\text{ nm}$. Este indicador es sensible al foto-apagado (en inglés: *photo-bleaching*) por lo cual se usó la menor intensidad de láser posible. La fluorescencia fue adquirida escaneando una línea orientada sobre el eje mayor del miocito a $1,4\text{ mseg}$ por línea de barrido, barriendo 512 líneas (512 pixeles) por imagen (Figura 27).

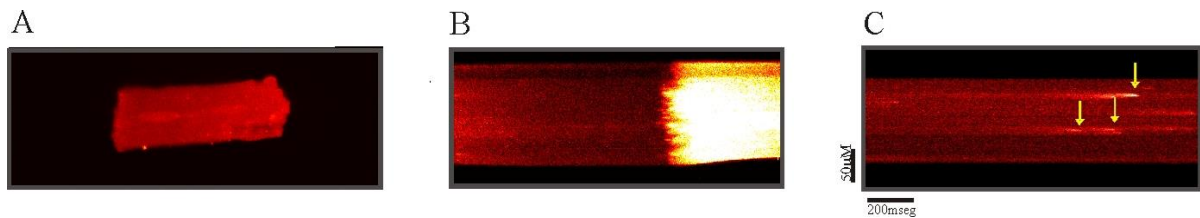


Figura 27. Imágenes del microscopio confocal donde se observa el Ca^{2+} intracelular y chispas de Ca^{2+} en miocitos aislados. A) imagen bajo el microscopio de una célula sin estímulo eléctrico B) avance del frente de Ca^{2+} en una célula con estímulo C) chispas de Ca^{2+} (flechas).

Luego de 20min de estabilización, los miocitos se sometieron al protocolo de isquemia-reoxigenación simulada de acuerdo a lo descrito por Villa Petroff y col. (2007) con algunas modificaciones (Figura 28). La “solución isquémica” contenía (en mM): 123 ClNa; 20 HEPES; 0,9 PO_4HNa ; 8 ClK; 0,5 SO_4Mg ; 2,5 Cl_2Ca y 20 lactato de Na, gaseada con 100% de N_2 y pH ajustado a 6,2 con $OHNa$. Luego de la sub-perfusión con solución isquémica durante 15 min, los miocitos se reoxigenaron con la solución de HEPES inicial durante 10 min.

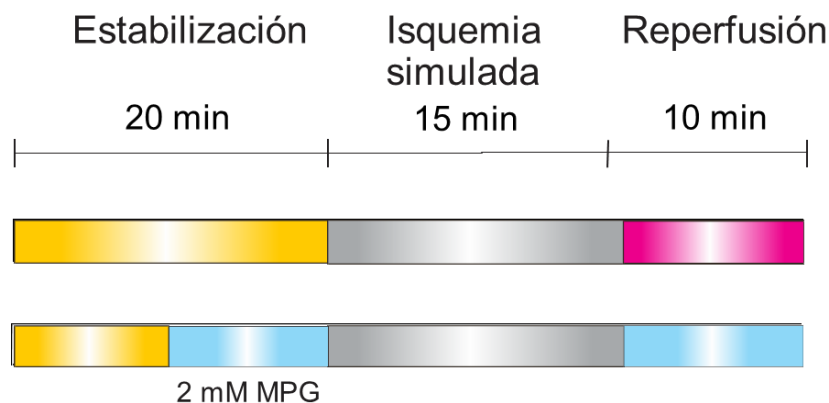


Figura 28. Esquema del protocolo de los experimentos de isquemia simulada y reoxigenación en miocitos aislados.

Cuando se usó MPG, éste se sub-perfundió 10min antes de la isquemia simulada y durante la reoxigenación, a una concentración de 2mM (Figura 28).

El análisis de las imágenes obtenidas se realizó con el software ImageJ. Para el análisis de la frecuencia de chispas de Ca^{2+} se utilizó el complemento Sparkmaster que ha sido diseñado y validado para el estudio de la frecuencia y características individuales de las chispas de Ca^{2+} (Picht y col. 2007).

5. Análisis estadístico

Los resultados promedio fueron expresados como la media \pm error estándar. Para el estudio de significación se utilizó el test de t-Student para muestras apareadas o independientes. Para la comparación entre diferentes grupos se utilizó el test de Análisis de Varianza (ANOVA). Las diferencias estadísticas observadas con ANOVA fueron examinadas con el test de Newman-Keuls. El procesamiento estadístico del número de arritmias entre dos grupos diferentes se analizó mediante la prueba de Mann-Whitney. En todos los casos se consideró $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Sección 1: Balance redox en la I/R

1.1. Evaluación del estrés oxidativo

Como primer objetivo nos propusimos evaluar el estrés oxidativo causado por nuestro protocolo experimental de I/R en los corazones perfundidos.

Como el estrés oxidativo resulta del desbalance entre la producción de ROS/RNS y las defensas antioxidantes, analizamos en primer lugar la producción de ROS a través del uso del colorante dihidroetidio (DHE). Cortes de corazones controles o sometidos al protocolo de I/R se tiñeron con este reactivo que detecta particularmente al radical superóxido (Benov y col. 1998). La intensidad de fluorescencia del DHE fue mayor en corazones sometidos a I/R respecto a los controles. Este incremento no se observó cuando el protocolo de I/R se realizó en corazones tratados con el antioxidante MPG (Figura 29).

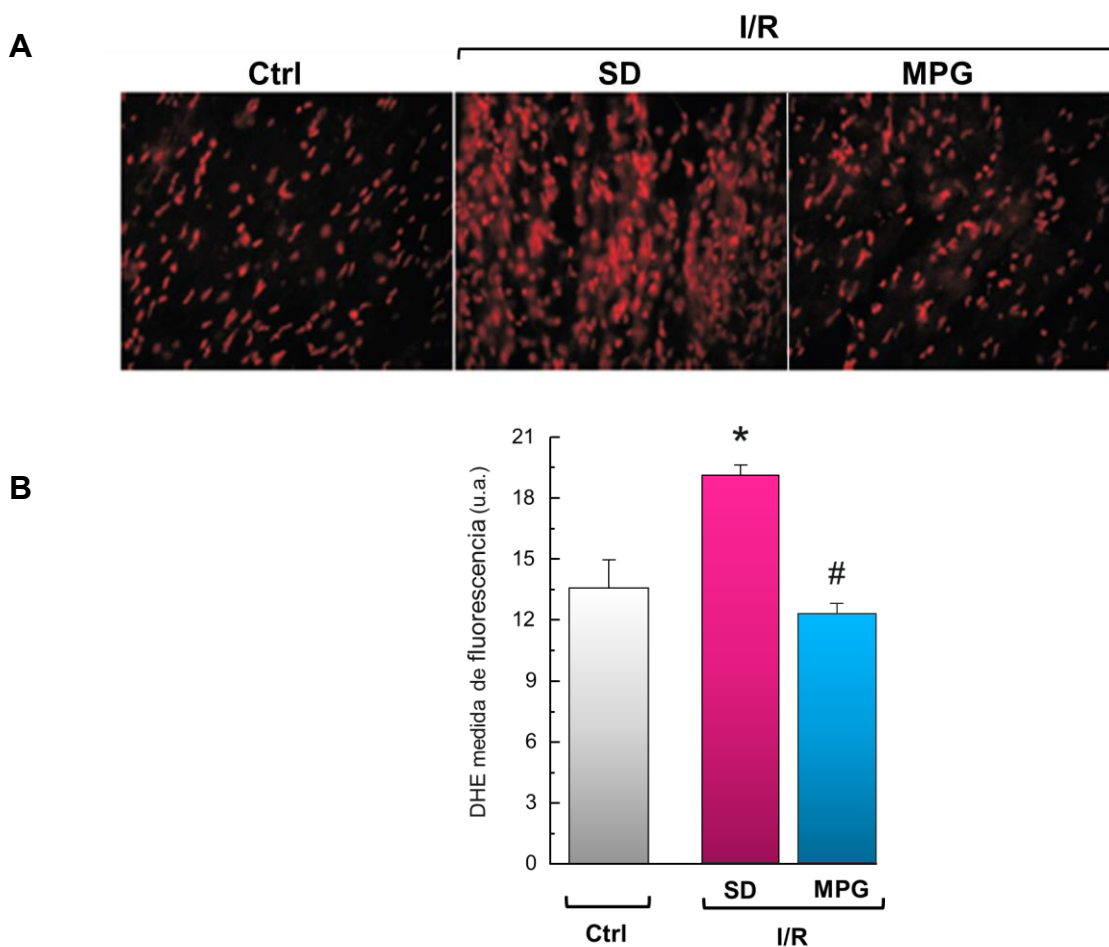


Figura 29. El MPG disminuye la producción de ROS durante la reperusión. A) Imágenes representativas de secciones de corazones controles (Ctrl) y luego de la I/R, en ausencia (SD) y presencia de MPG teñidos con dihidroetidio (DHE) indicando la producción de ROS, B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del DHE. Los datos representan la media \pm ES (n= 3-6 corazones), * p <0,05 vs. Ctrl, # p <0,05 vs. I/R SD.

Medimos también el contenido de glutatión reducido (GSH), antioxidante citosólico que juega un rol central en la defensa contra el daño oxidativo. En homogenatos de corazones sometidos a I/R los niveles de GSH se redujeron significativamente respecto a los presentes en corazones controles. El tratamiento de los corazones isquémicos con MPG preservó el contenido de GSH, siendo su valor similar al de los corazones controles (Figura 30).

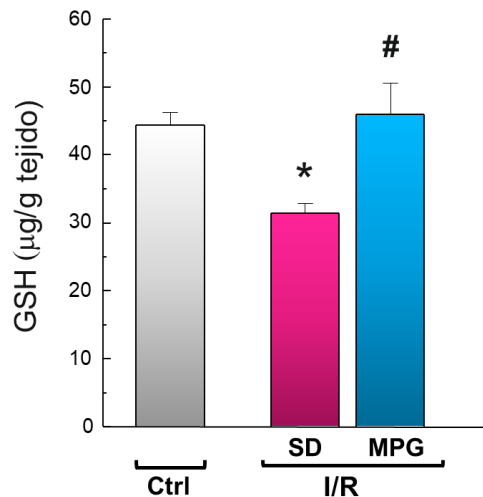


Figura 30. Contenido de glutatión reducido (GSH) en el modelo de I/R. Valores promedio del contenido de GSH medido en tejido de corazones Ctrl y sometido a I/R en ausencia (SD) y presencia de MPG. Los datos, expresados como µg/g de tejido, representan la media ± ES (n= 3-6 corazones), * $p < 0,05$ vs. Ctrl, # $p < 0,05$ vs. I/R SD.

1.2. Discusión

Los resultados indican que la I/R provoca estrés oxidativo, al que contribuirían tanto el aumento en la producción de ROS como la disminución de las defensas antioxidantes celulares. Esto es consistente con varios trabajos que demuestran un abrupto aumento en la producción de ROS/RSN durante la reperusión (Bolli y col. 1988; Myers y col. 1985; Wang y col. 1996) que se correlaciona directamente con la disminución del GSH intracelular (Leichtweis y Ji 2001; Slodzinski y col. 2008).

Nuestros experimentos muestran además que el tratamiento con MPG, resulta efectivo para prevenir el estrés oxidativo inducido por la I/R. Disminuyendo no solo el contenido de superóxido en el tejido cardíaco, sino también preservando parcialmente el nivel de GSH, sugiriendo una menor producción de ROS o un mejoramiento del principal sistema antioxidante en dichas condiciones.

Sección 2: Modificaciones redox del RyR2

2.1. Evaluación de las modificaciones redox del RyR2 y su efecto sobre las arritmias de reperfusión

Los ROS/RNS juegan un rol crítico en la regulación de la apertura del RyR2. Se ha demostrado que el estrés oxidativo desarrollado durante el curso de diferentes enfermedades cardíacas puede producir cambios sobre el RyR2 que promueven fugas de Ca^{2+} desde el RS, dando lugar a la aparición de arritmias (Cutler y col. 2012; Donoso y col. 2014).

Para evaluar la oxidación del RyR2 determinamos su contenido de tioles libres (cisteínas reducidas) por la técnica del mBB. Como se muestra en la Figura 31, la fluorescencia del mBB sobre el RyR2 disminuyó significativamente en corazones sometidos a I/R respecto a corazones controles. Esto es consistente con un aumento de la oxidación de las cisteínas del canal en la I/R. La presencia de MPG, que como se demostró anteriormente previene el estrés oxidativo, evitó dicha oxidación preservándose el contenido basal de tioles libres del RyR2.

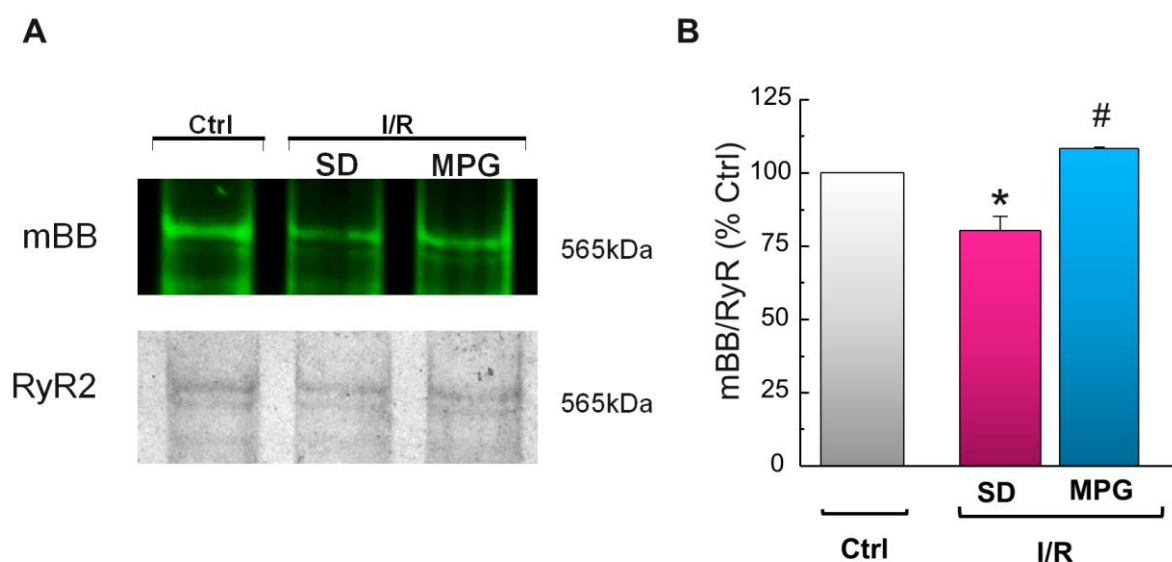


Figura 31. MPG restaura el contenido de tioles libres del RyR2 durante la reperfusión. A) Imagen representativa de geles que muestran la intensidad de fluorescencia del monobromobimane (mBB) sobre el RyR2 y la proteína detectada en los geles teñidos con azul de Coomassie. B) Resultados totales del contenido de tioles libres del RyR2 (fluorescencia del mBB normalizada por proteína) en corazones Ctrl, I/R sin (SD) y con MPG expresados como % Ctrl. Los datos representan la media \pm ES (n= 3-6 corazones), * $p < 0,05$ vs. Ctrl, # $p < 0,05$ vs. I/R SD.

Como siguiente objetivo, nos propusimos evaluar el tipo de oxidaciones que ocurren sobre el RyR2 como consecuencia del estrés oxidativo causado por la I/R. Analizamos la S-glutationilación y la S-nitrosilación del RyR2, que como vimos en el punto 2 de la Introducción, son dos modificaciones oxidativas reversibles que ocurren sobre las cisteínas. Observamos que durante la reperfusión temprana, el nivel de ambas oxidaciones aumentó significativamente respecto a los niveles controles y que la perfusión de los corazones con MPG, anuló el incremento de la S-nitrosilación y de la S-glutationilación del RyR2 provocado por la I/R (Figura 32).

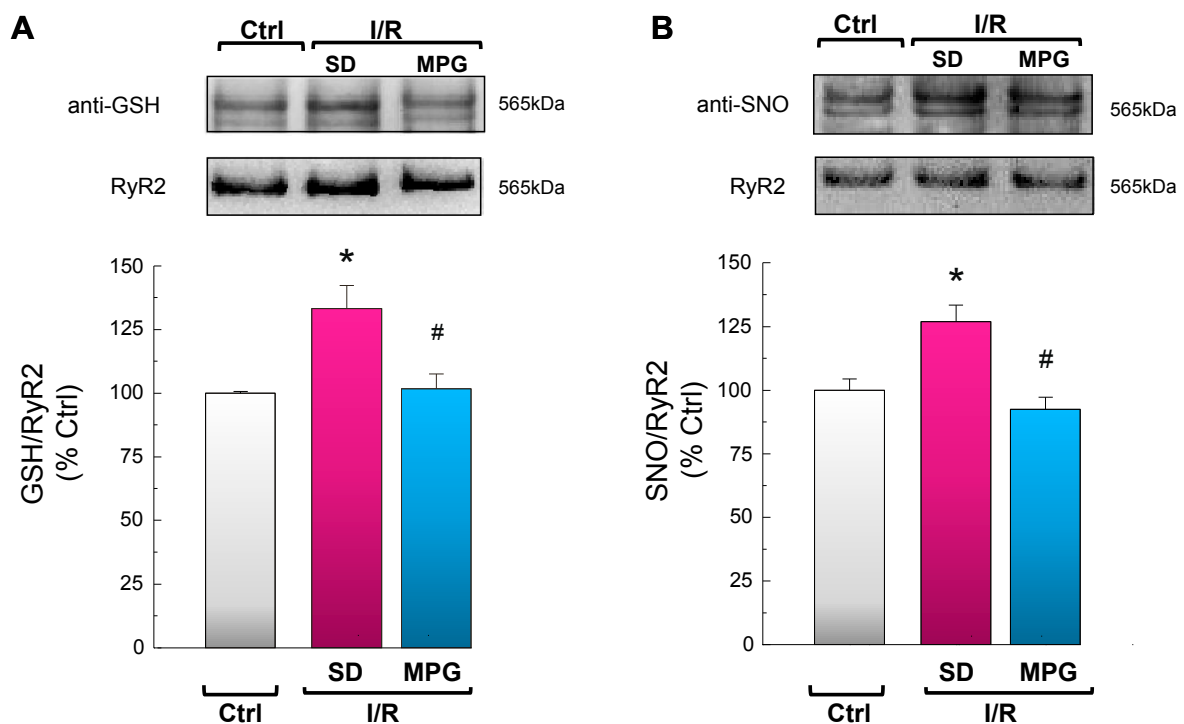


Figura 32. Oxidaciones reversibles del RyR2. Western blots representativos y resultados totales de la S-glutationilación (A) y S-nitrosilación (B) del RyR2 en corazones Ctrl y sometidos a I/R en ausencia (SD) o presencia de MPG. Los resultados (nivel de oxidación normalizado por cantidad de RyR2) se expresan como % del Ctrl. Los datos representan la media \pm ES (n= 7-13 corazones). * $p < 0,05$ vs. Ctrl, # $p < 0,05$ vs. I/R SD. GSH, glutatión; SNO, nitrosocisteína.

A continuación estudiamos el impacto del estrés oxidativo sobre las arritmias de reperfusión. Los eventos arrítmicos que ocurren en la reperfusión postisquémica son más frecuentes durante los primeros 3 min de la reperfusión y varían en gravedad desde latidos prematuros (LPs) hasta episodios de taquicardia ventricular (TV), arritmia potencialmente peligrosa porque puede desencadenar fibrilación

ventricular o muerte súbita. En la Figura 33 se muestran registros simultáneos representativos de la actividad mecánica y eléctrica donde se observan los distintos eventos arrítmicos obtenidos en nuestras condiciones experimentales.

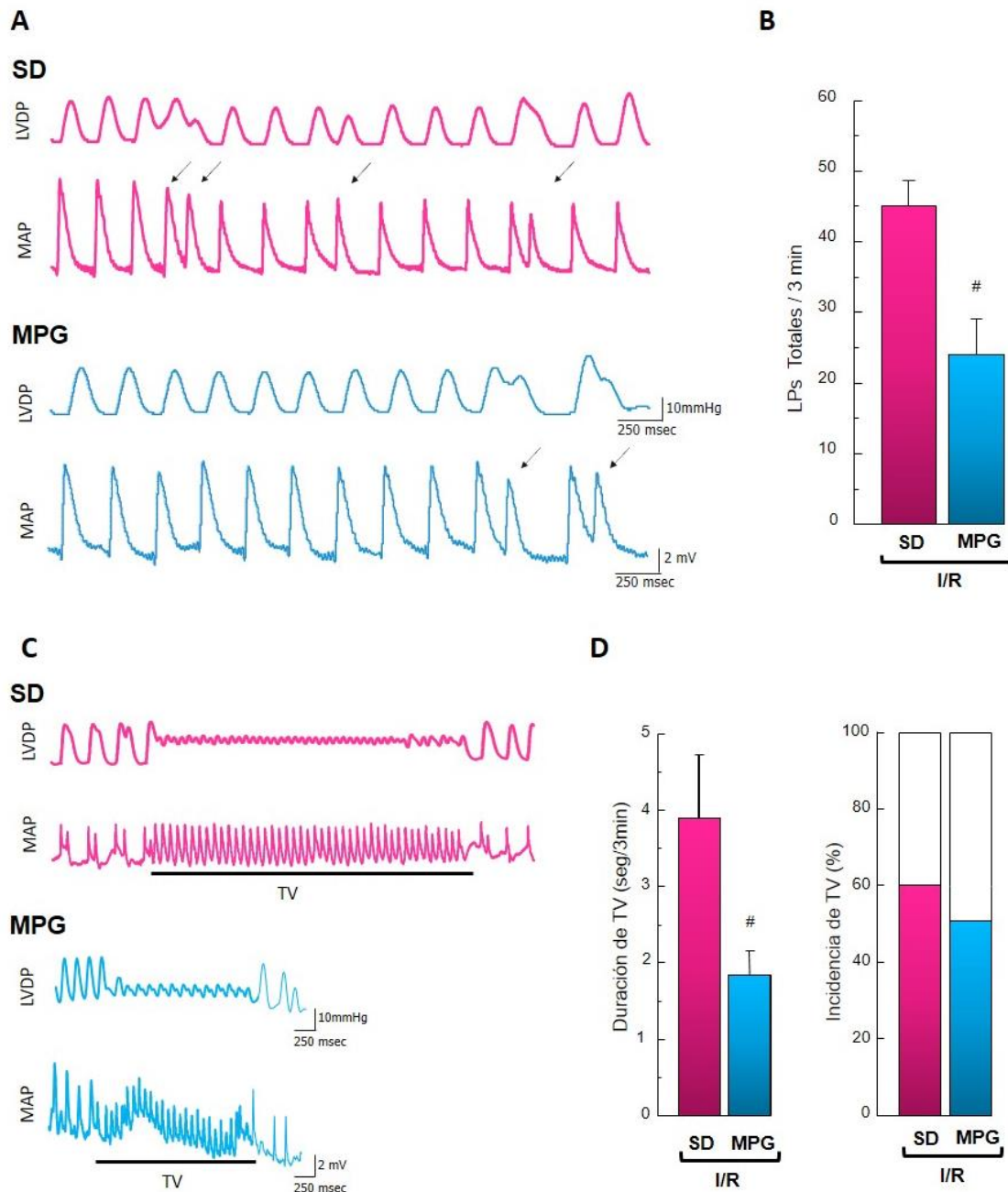


Figura 33. El MPG reduce la severidad de las arritmias de reperfusion. Registros representativos simultáneos de la actividad mecánica (LVDP) y eléctrica del corazón (MAP) mostrando los LPs (flechas, A) y TV (C) durante la reperfusion temprana en ausencia (SD) y presencia de MPG. Resultados totales de los LPs (B) y duración total e incidencia de TV (D) durante los primeros 3 min de reperfusion en las distintas condiciones. Los LPs fueron evaluados estadísticamente con el test de Mann-Whitney. Los datos representan la media \pm ES (n=5-14 corazones). # $p < 0,05$ vs. I/R SD.

Cuando los corazones de rata se sometieron a I/R en presencia de MPG, el número de LPs se redujo aproximadamente un 50% disminuyendo también la duración y la incidencia de los episodios de TV (Figura 33). Cuando el MPG se administró sólo durante la reperfusión los resultados obtenidos fueron similares (I/R+MPG: 26±4 vs I/R: 44±4 LPs totales/3 min).

Los resultados hasta aquí presentados muestran que el MPG impide la oxidación del RyR2 y disminuye el número y la severidad de las arritmias de reperfusión, sugiriendo que la oxidación del RyR2 podría contribuir a esta arritmogénesis.

Como siguiente objetivo nos propusimos inhibir selectivamente las modificaciones oxidativas del RyR2 detectadas con la finalidad de establecer su relevancia en la generación de arritmias de reperfusión. Experimentos previos de Sánchez y col. (2008) en corazones de perros expuestos a incrementos de frecuencia o después del ejercicio demostraron un aumento de la S-glutacionilación del RyR2 debido a un incremento en la actividad de la NOX. En nuestras condiciones experimentales también pudimos comprobar una mayor actividad de la NOX al inicio de la reperfusión que pudo ser prevenida por el tratamiento de los corazones con APO, un inhibidor de la NOX (Figura 34).

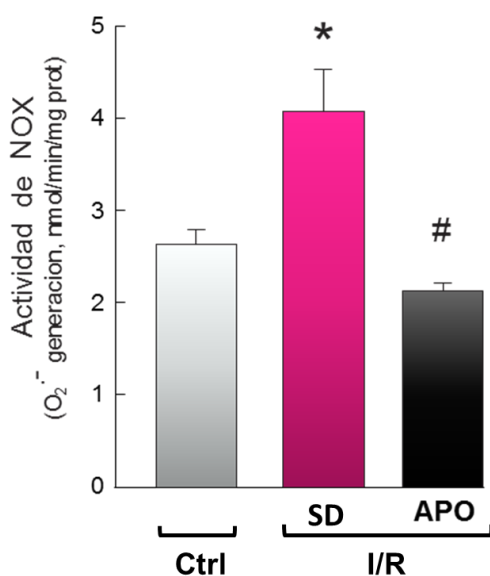


Figura 34. Actividad de NADPH oxidasa (NOX). Medida de la generación del anión superóxido en vesículas aisladas de corazones Ctrl y sujetos a I/R en ausencia (SD) y presencia de APO. Los datos se expresan como nanomoles de anión superóxido por miligramo de proteína por min y representan la media ± ES (n= 3-10 corazones). * $p < 0,05$ vs. Ctrl, # $p < 0,05$ vs. I/R SD.

Teniendo en cuenta estos hallazgos realizamos experimentos de I/R en presencia de APO, inhibidor de la NOX y de L-NAME, inhibidor de la NOS, y evaluamos su efecto sobre la S-glutacionilación y la S-nitrosilación del RyR2 respectivamente.

Como muestra la Figura 35, el tratamiento con APO disminuyó selectivamente el aumento de la S-glutationilación del RyR2, sin afectar los niveles de S-nitrosilación. Por otro parte, en los corazones perfundidos con L-NAME se observó una reducción del incremento de la S-nitrosilación causado por la reperfusión, sin modificación de los niveles de S-glutationilación del RyR2

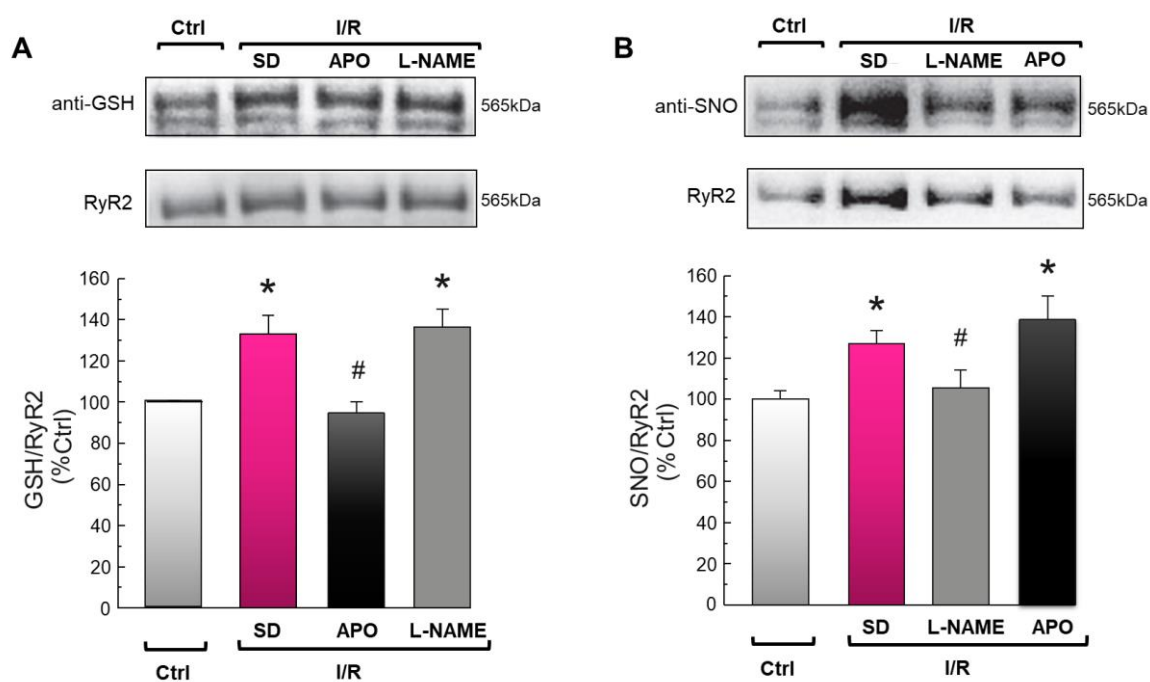


Figura 35. Inhibición selectiva de cambios redox reversibles del RyR2. Western blots representativos y resultados totales de la S-Glutationilación (A) y S-Nitrosilación (B) del RyR2 en corazones Ctrl y sometidos a I/R en ausencia (SD) y presencia de APO o L-NAME. Los resultados se expresan normalizados por RyR2 y como % de Ctrl. Los datos representan la media \pm ES ($n=7-13$ corazones). * $p<0,05$ vs. Ctrl, # $p<0,05$ vs. I/R SD.

Para determinar la contribución relativa de la S-glutationilación y la S-nitrosilación en la generación de arritmias de reperfusión, se evaluó la aparición de LPs y la duración e incidencia de TV en presencia de APO y L-NAME. Se observó que el tratamiento con estos inhibidores no atenuó la arritmogénesis generada por la reperfusión, como ocurrió en presencia de MPG. Muy por el contrario, APO y L-NAME aumentaron significativamente el número de LPs (Figura 36 A) y provocaron una mayor incidencia de TV, acompañada por un incremento en la duración de este tipo de eventos arrítmicos con respecto a los corazones sometidos a I/R sin tratamiento (Figura 36 C y B).

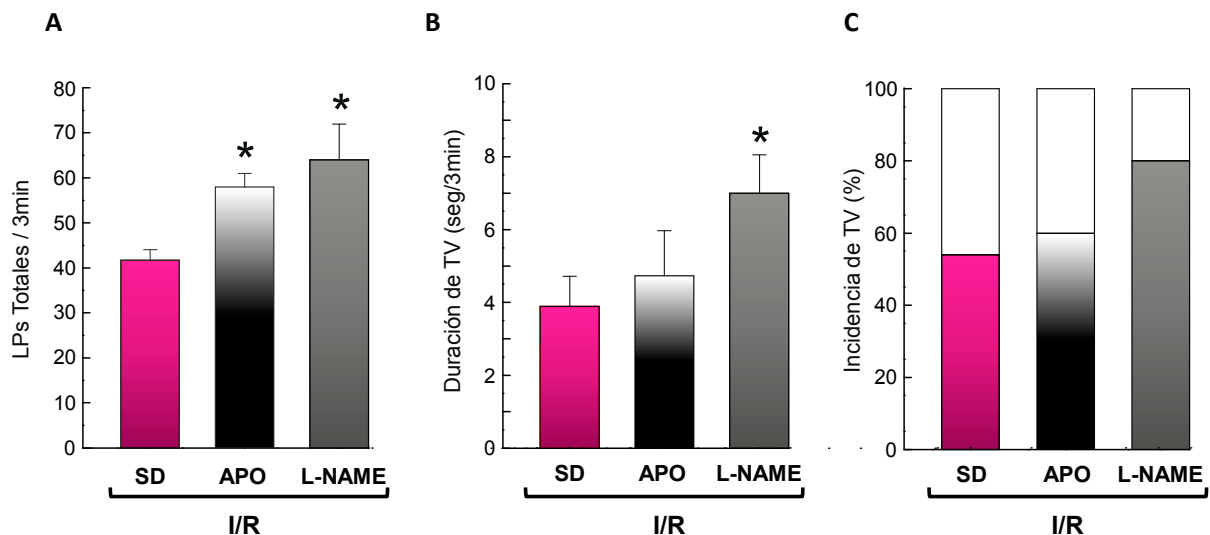


Figura 36. Inhibición selectiva de las oxidaciones reversibles y arritmias de reperfusión. A) Latidos prematuros (LPs), B) duración y C) incidencia de taquicardia ventricular (TV) durante los primeros 3 min de reperfusión en corazones sometidos a I/R en ausencia y presencia de APO o L-NAME. Los datos representan la media \pm SE (n 4-11 corazones). * $p < 0,05$ vs. I/R.

Los resultados de estos últimos experimentos indicaban que, dependiendo de la herramienta farmacológica usada para prevenir la S-glutationilación y la S-nitrosilación, podían detectarse efectos beneficiosos (MPG) o perjudiciales (APO o L-NAME) sobre la generación de arritmias. Para estudiar si esta discrepancia se originaba por el diferente entorno oxidativo derivado de los distintos tratamientos, realizamos la medición de GSH en los corazones sometidos a I/R en presencia de APO o L-NAME. Como se observa en la Figura 37, ninguno de los inhibidores fue capaz de impedir la disminución de la defensa antioxidante causada por la I/R, como sí lo hizo el MPG (Figura 30).

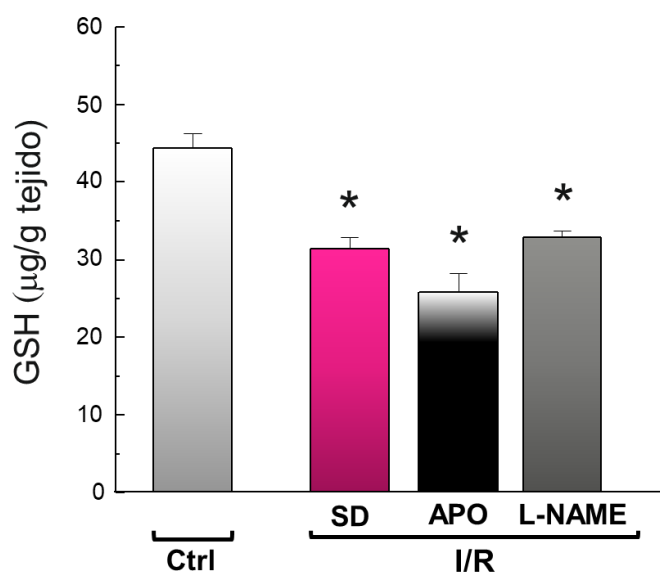


Figura 37. Contenido de GSH reducido en el modelo de I/R. Valores promedio del contenido de glutatión reducido (GSH) medido en tejido de corazones Ctrl y sometido a I/R en ausencia (SD) y presencia de APO o L-NAME. Los datos, expresados como µg/g de tejido, representan la media ± ES (n= 3-6 corazones), *p<0,05 vs. Ctrl.

Así, el aparente efecto beneficioso o deletéreo de la S-glutationilación y la S-nitrosilación sobre la actividad eléctrica durante la reperfusión parece depender del entorno redox el cual es diferencialmente afectado por los fármacos utilizados.

2.2. Efectos de los distintos tratamientos sobre la contractilidad del corazón sometido a I/R

Dado que la actividad arritmogénica durante la reperfusión se ha vinculado a pérdidas espontáneas de Ca²⁺ del RS y esto podría alterar el contenido de Ca²⁺ de la organela y en consecuencia la contractilidad, decidimos evaluar el impacto de los distintos antioxidantes sobre la función contráctil de corazones sometidos a I/R.

Como muestra la Figura 38 la presencia de MPG no modificó el comportamiento contráctil de los corazones durante la reperfusión.

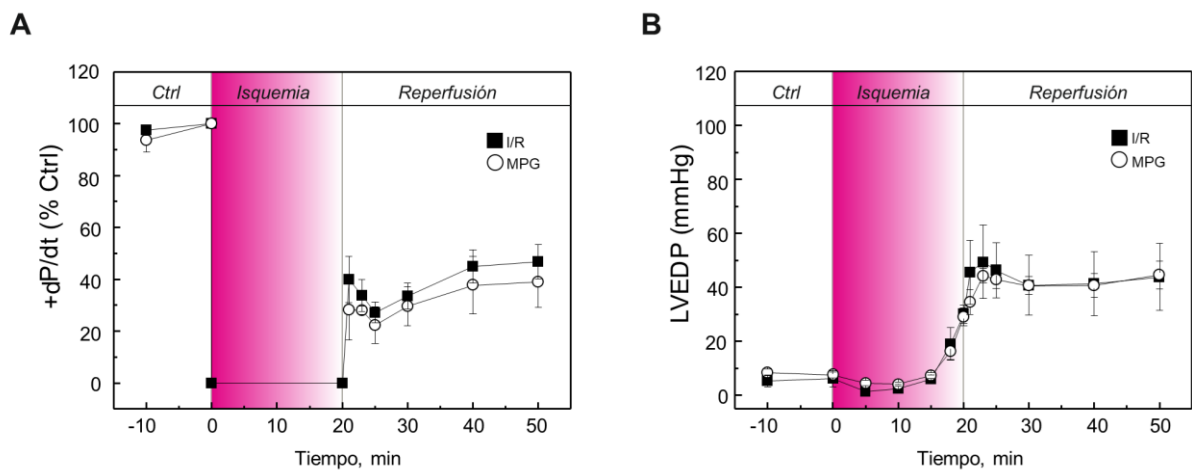


Figura 38. Efectos del MPG sobre la recuperación contráctil durante la reperfusión. A) Transcurso en el tiempo de la máxima velocidad de desarrollo de la presión (+dP/dt) y B) de la presión diastólica final (LVEDP) en corazones sometido a I/R en presencia o ausencia de MPG. Los datos representan la media \pm SE (n 4-11 corazones).

En cambio, el tratamiento de los corazones con APO o L-NAME provocó un deterioro drástico en la recuperación mecánica durante la reperfusión, evidenciado por una disminución de la máxima velocidad de desarrollo de la presión y un aumento de la presión diastólica final (Figura 39).

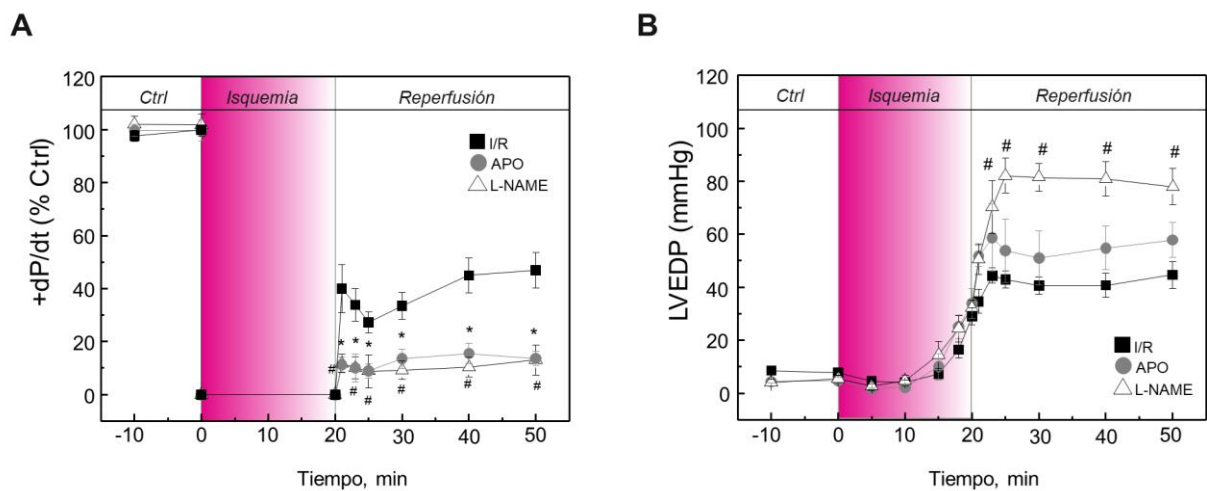


Figura 39. Efectos de la perfusión con APO y L-NAME sobre la recuperación contráctil durante la reperfusión. A) Transcurso en el tiempo de la máxima velocidad de desarrollo de la presión del ventrículo izquierdo (+dP/dt) y B) de la presión diastólica final (LVEDP) en corazones sometidos a I/R en presencia y ausencia de APO o L-NAME. Los datos representan la media \pm SE (n 4-11 corazones). * $p < 0,05$ vs. I/R.

Considerando en conjunto los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad mecánica y eléctrica de los corazones, podemos concluir que la disminución de arritmias provocada por el MPG no resultó en una mejora de la función contráctil mientras que el mayor número y severidad de arritmias encontradas por el tratamiento con APO y L-NAME, impactó negativamente en la recuperación mecánica postisquémica.

2.3. Discusión

En este trabajo de Tesis demostramos la oxidación del RyR2 durante la reperfusión temprana. Esto se evidenció por una disminución del contenido de tioles libres y también por un aumento de la S-nitrosilación y de la S-glutationilación de la proteína. Cabe señalar que si bien estudiamos en particular estas dos modificaciones redox, no podemos descartar que otras oxidaciones reversibles (formación de puente disulfuro) o irreversibles (sulfínico y sulfónico) de las cisteínas o bien oxidaciones a nivel de otros aminoácidos del RyR2 también estén ocurriendo en la I/R.

Nuestros experimentos mostraron que la prevención simultánea de la S-glutationilación y de la S-nitrosilación disminuyó significativamente el número de arritmias. En una primera aproximación, estos resultados eran consistentes con los trabajos que le atribuyen a la oxidación de las cisteínas del RyR2, un rol importante en la pérdida espontánea de Ca^{2+} del RS, formación de ondas de Ca^{2+} , arritmias y disfunción contráctil, en distintas patologías cardíacas como el infarto, la insuficiencia cardíaca y la cardiomiopatía de la distrofia muscular de Duchene (Marks 2000; Belevych y col. 2009 y 2011; Wang y col. 2015; Zima y Mazurek 2016).

Sin embargo la eliminación selectiva de la S-glutationilación y la S-nitrosilación nos llevó a conclusiones opuestas: APO y L-NAME aumentaron las arritmias de reperfusión y provocaron un deterioro en la recuperación contráctil post-isquémica, sugiriendo un rol protector para ambas modificaciones redox.

La explicación de esta aparente contradicción surgió al estudiar el impacto que tenían las drogas utilizadas sobre el estrés oxidativo celular. El MPG evitó las modificaciones redox del RyR2 estudiadas y previno el estrés oxidativo inducido por la reperfusión. En cambio, APO y L-NAME si bien impidieron respectivamente la S-glutationilación y la S-nitrosilación del canal, no fueron capaces de limitar el desbalance redox celular post-isquémico. Es decir, la remoción de las

modificaciones redox reversibles ocurrió en un entorno pro-oxidante. Nuestra propuesta es que los tioles libres que quedaron expuestos en esta condición, sufrieron oxidaciones máximas que produjeron una alteración pro-arritmogénica del canal. Lamentablemente, no pudimos confirmar este hecho debido a que la determinación de los derivados sulfínicos y sulfónicos de las cisteínas del RyR2, está fuera del alcance de este trabajo de Tesis. Igualmente como ya se mencionó en la Introducción, la naturaleza protectora de la S-glutationilación y S-nitrosilación, ha sido sugerida por varios investigadores (González y col. 2007; Sánchez y col. 2008; González y col. 2010; Cutler y col. 2012). En concordancia con nuestros resultados, se ha informado que la delección genética o inhibición farmacológica de la NOS, que produce la disminución de la S-nitrosilación del RyR2, se asoció con un aumento de la pérdida de Ca^{2+} desde el RS en cardiomiocitos aislados de ratón (González y col. 2007). El mismo grupo de investigadores demostró más tarde en miocitos ventriculares aislados de corazones de ratas insuficientes, que el desbalance nitroso-redox (disminución de la S-nitrosilación y aumento de la oxidación del RyR2) conduce a un incremento en la pérdida de Ca^{2+} por el RS, manejo de Ca^{2+} alterado y disfunción contráctil (González y col. 2010). De manera similar, Cutler y col. (2012), demostraron en el corazón intacto de cobayo que este desbalance nitroso-redox del RyR2 deriva en un incremento de la liberación espontánea de Ca^{2+} del RS que desencadena arritmias ventriculares, en condiciones de Ca^{2+} elevado y estrés oxidativo.

Resulta pertinente discutir aquí por qué el efecto anti-arritmico beneficioso del tratamiento con MPG no se asoció con una mejora de la recuperación contráctil durante la reperfusión. Según plantearon Eisner y col. (1998), el RS puede regular su contenido de Ca^{2+} a través de modificar los flujos de Ca^{2+} del sarcolema, mediados por CCL y NCX. Los autores proponen que debido a este mecanismo de retroalimentación negativa los cambios de la carga de Ca^{2+} del RS son transitorios y pueden no traducirse en cambios de contractilidad. Por ejemplo, la menor pérdida de Ca^{2+} a través del RyR2 inducida por la presencia de MPG, debería haber conducido a un aumento en el contenido de Ca^{2+} del RS. Sin embargo una vez liberado al citosol, el ión promovería un menor influjo de Ca^{2+} por el CCL debido a una inactivación por Ca^{2+} del canal y una mayor extrusión del ion por el NCX en su modo directo, secuencia de eventos que evitaría la ganancia del contenido de Ca^{2+} del RS. Sin embargo, este mecanismo podría verse superado ante el aumento de la

severidad de las arritmias de reperfusión, como en el caso de la perfusión de los corazones con APO y L-NAME. La pérdida de oxidaciones reversibles (protectoras) y ganancia de oxidaciones severas (irreversibles) podrían tornar hiperactivo al RyR2, conduciendo a una masiva fuga de Ca^{2+} , con disminución de la carga del RS y empeoramiento de la recuperación contráctil.

Sección 3: Modificaciones redox de la quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina

3.1. Oxidación de la CaMKII

Hasta aquí hemos estudiado los efectos que el estrés oxidativo de la I/R provoca sobre la oxidación del RyR2, las arritmias de reperfusión y la recuperación contráctil. Pero como se mencionó previamente, la fosforilación del RyR2 por la CaMKII también desempeña un rol muy importante en las arritmias de reperfusión (Said y col. 2011). Dado que CaMKII puede ser activada por ROS (Erickson y col. 2008), buscamos establecer si, en nuestro protocolo experimental, la enzima se encuentra oxidada y si esta modificación contribuye a su activación y a la fosforilación de sus sustratos a nivel del RS, entre ellos el RyR2.

Como muestra la Figura 40, la oxidación de CaMKII (ox-CaMKII) aumentó al comienzo de la reperfusión y el tratamiento de los corazones con dos atrapadores de ROS como el MPG o el Tirón, previno este incremento. La perfusión con APO o L-NAME por el contrario, no afectó los niveles de oxidación de la quinasa inducidos por la reperfusión.

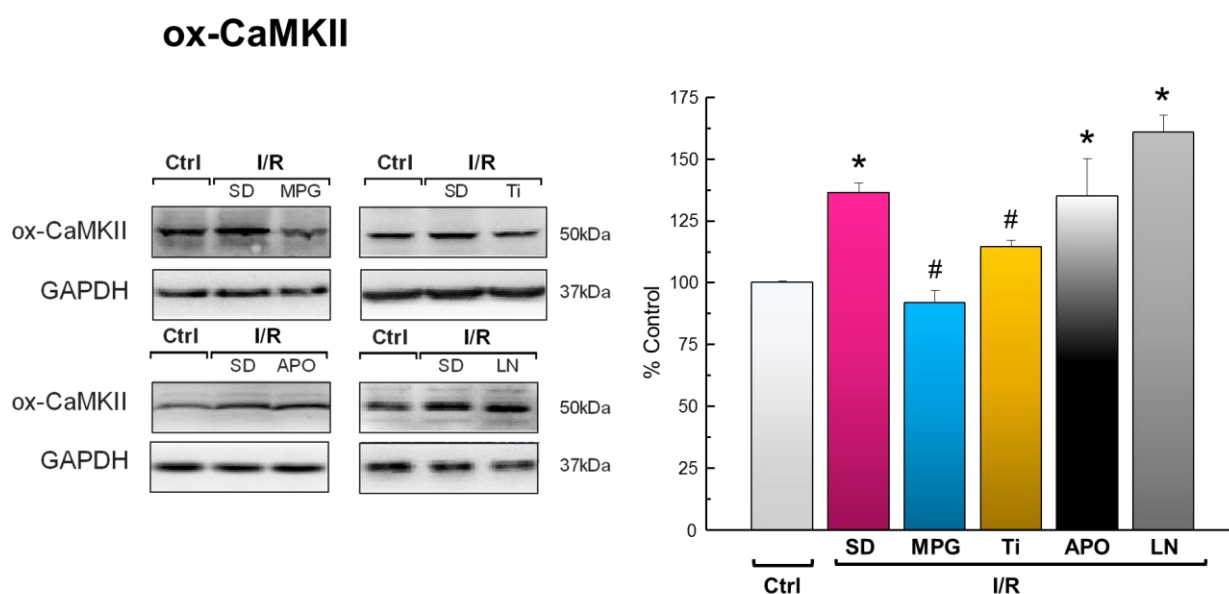


Figura 40. Oxidación de CaMKII (ox-CaMKII). Western blots representativos y resultados totales que muestran los niveles de oxidación de CaMKII en corazones Ctrl o sometidos a I/R en ausencia (SD) y presencia de los diferentes fármacos (MPG, Tirón (Ti), APO, L-NAME (LN)). Los resultados de ox-CaMKII/GAPDH se expresan como % del Ctrl. Los datos representan la media \pm ES (n=4-7 corazones por grupo). * $p < 0,05$ vs. Ctrl, # $p < 0,05$ vs. I/R SD.

Para evaluar si la oxidación de CaMKII contribuye a su actividad fosforilante, se midieron la fosforilación de la treonina 287 de CaMKII (autofosforilación, pCaMKII) y la fosforilación de sus proteínas diana: PLN y RyR2 en sus sitios específicos treonina 17 (pThr17-PLN) y serina 2815 (pSer2815-RyR2 para la rata) respectivamente. Confirmando resultados previos (Said y col. 2003), se detectaron aumentos de los niveles de fosforilación de las 3 proteínas al comienzo de la reperfusión (Figura 41). Inesperadamente, el tratamiento con MPG que había suprimido el aumento de ox-CaMKII inducido por la reperfusión (Figura 40), no redujo ni la autofosforilación de la quinasa ni la de sus sustratos (Figuras 41, 42 y 43). Por otra parte, la administración de APO y L-NAME para inhibir la NOX y la NOS respectivamente, no afectó el aumento de las fosforilaciones dependientes de CaMKII inducidas por la reperfusión.

pCaMKII

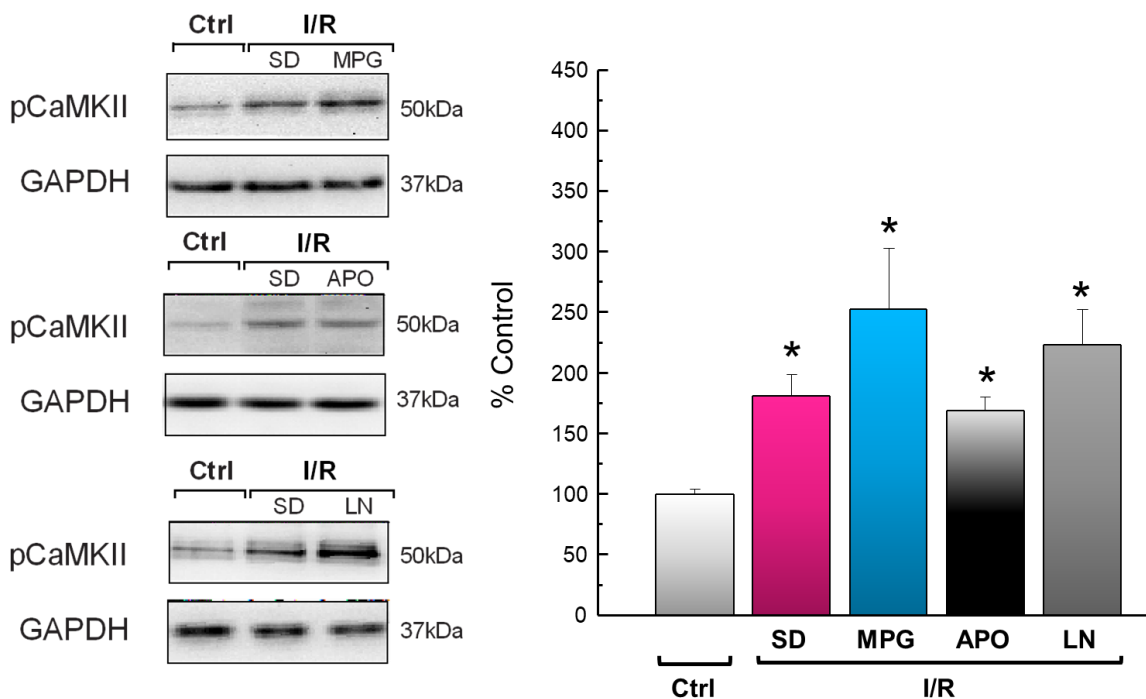


Figura 41. La actividad de CaMKII es independiente de su estado de oxidación. Western blots representativos y resultados totales que muestran la autofosforilación de CaMKII (pCaMKII), en condiciones controles (Ctrl) o durante I/R en ausencia (SD) y presencia de las diferentes intervenciones (MPG, APO y LN). Los resultados se expresan como % del Ctrl para pCaMKII/GAPDH. Los datos representan la media \pm ES (n= 3-8 corazones por grupo). * $p < 0,05$ vs. Ctrl.

pThr17-PLN

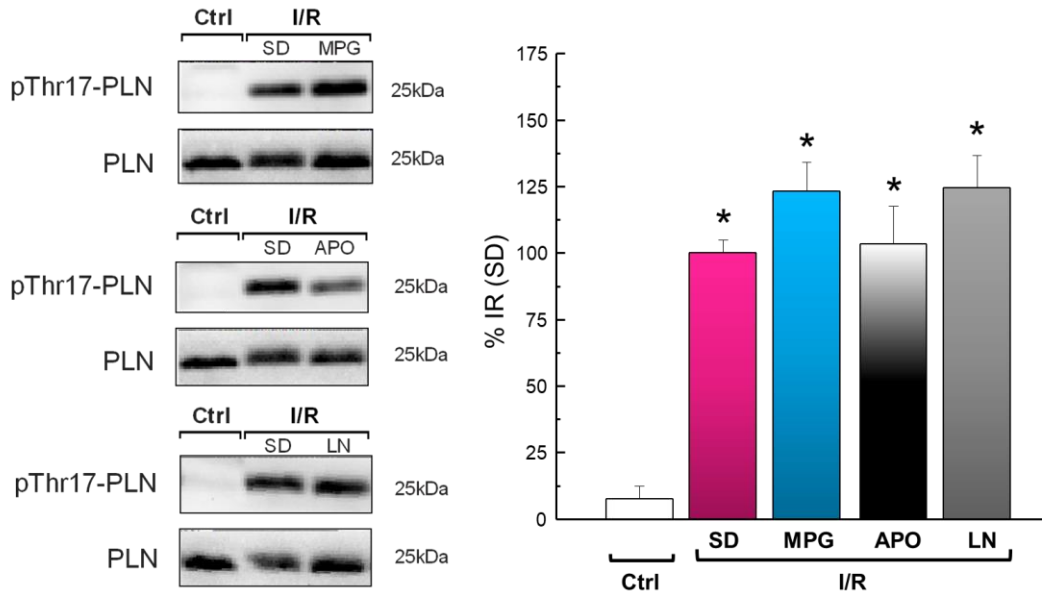


Figura 42. La actividad de CaMKII es independiente de su estado de oxidación. Western blots representativos y resultados totales que muestran fosforilación de pThr17-PLN, en condiciones controles (Ctrl) o durante I/R en ausencia (SD) y presencia de las diferentes intervenciones (MPG, APO y LN). Los resultados se expresan como % de I/R SD para pThr17-PLN/PLN. Los datos representan la media \pm ES ($n = 3-8$ corazones por grupo). * $p < 0,05$ vs. Ctrl.

pSer2815-RyR2

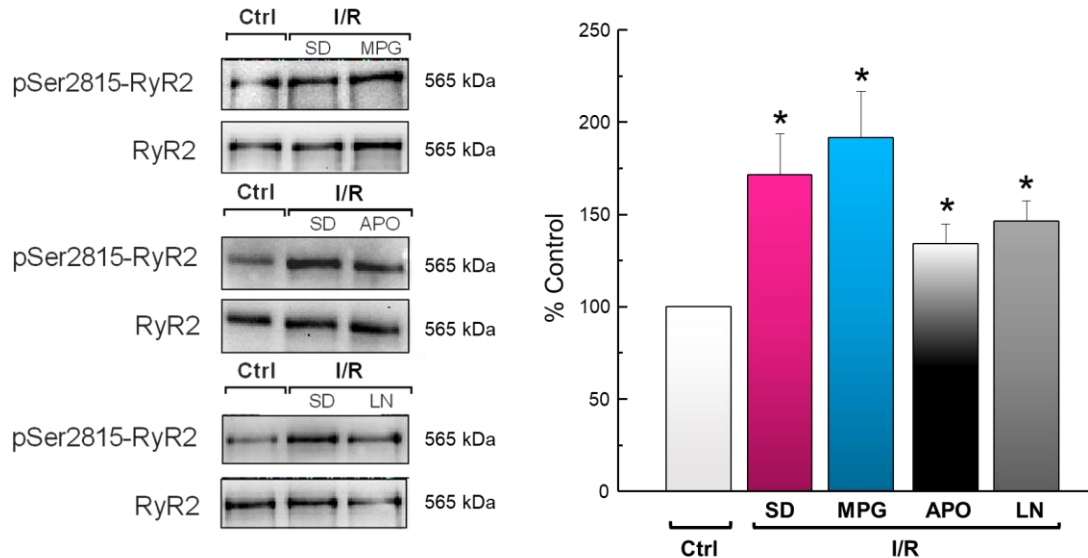


Figura 43. La actividad de CaMKII es independiente de su estado de oxidación. Western blots representativos y resultados totales que muestran la fosforilación de pSer2815-RyR2, en condiciones controles (Ctrl) o durante I/R en ausencia (SD) y presencia de las diferentes intervenciones (MPG, APO y LN). Los resultados se expresan como % del Ctrl para pSer2815-RyR2/RyR2. Los datos representan la media \pm ES ($n = 3-8$ corazones por grupo). * $p < 0,05$ vs. Ctrl.

3.2. Discusión

Los resultados presentados en esta sección demuestran que la CaMKII se oxida durante la reperfusión temprana. El aumento de ox-CaMKII parece ser el resultado de un mecanismo independiente de la actividad de la NOX y de la NOS, que desacoplada también es capaz de producir ROS. Posiblemente sean las mitocondrias las responsables de proveer los ROS implicados en esta oxidación. Lo interesante de estos resultados es que la modificación oxidativa de la CaMKII no fue necesaria para sostener su actividad enzimática al inicio de la reperfusión, ya que las fosforilaciones de sus sustratos no se alteraron cuando se impidió el incremento de su oxidación. Es probable que la sobrecarga de Ca^{2+} producida al inicio de la reperfusión proporcione el Ca^{2+} necesario para activar y sostener la actividad de CaMKII, independientemente de su estado de oxidación.

La falta de relación entre la oxidación y la activación de CaMKII encontrada en nuestros experimentos es consistente con lo reportado por Bell y col. (2015). Este grupo recientemente describió niveles similares de ox-CaMKII asociados con diferentes grados de fosforilación de CaMKII y PLN en corazones atontados de ratas machos y hembras.

Finalmente, la falta de efecto del L-NAME sobre la autofosforilación de CaMKII y la fosforilación de sus proteínas diana, sugiere indirectamente que la activación por NO de la enzima (S-nitrosilación) propuesta por varios grupos de investigación (Gutiérrez y col. 2013; Curran y col. 2014; Erickson y col. 2015) tampoco sería necesaria para sostener la actividad de CaMKII en nuestras condiciones experimentales.

Sección 4: Contribución de la fosforilación y oxidación del RyR2 a las arritmias de reperfusión y a las pérdidas de Ca²⁺ del RS

4.1. Contribución de la fosforilación y oxidación del RyR2 a las arritmias de reperfusión

Hasta aquí hemos considerado el rol de los ROS/RNS en la génesis de las arritmias de reperfusión, sugiriendo la implicancia de modificaciones redox del RyR2 en estos eventos. Estas modificaciones del RyR2 ocurrieron en simultáneo con un aumento de la fosforilación del canal por CaMKII (Figura 41) modificación que, como demostramos previamente, es pro-arritmogénica (Said y col. 2011). Con el fin de diseccionar los efectos producidos por los cambios redox de aquellos provocados por la fosforilación, en los siguientes experimentos utilizamos ratones transgénicos carentes del sitio de fosforilación dependiente de CaMKII del RyR2 (S2814A).

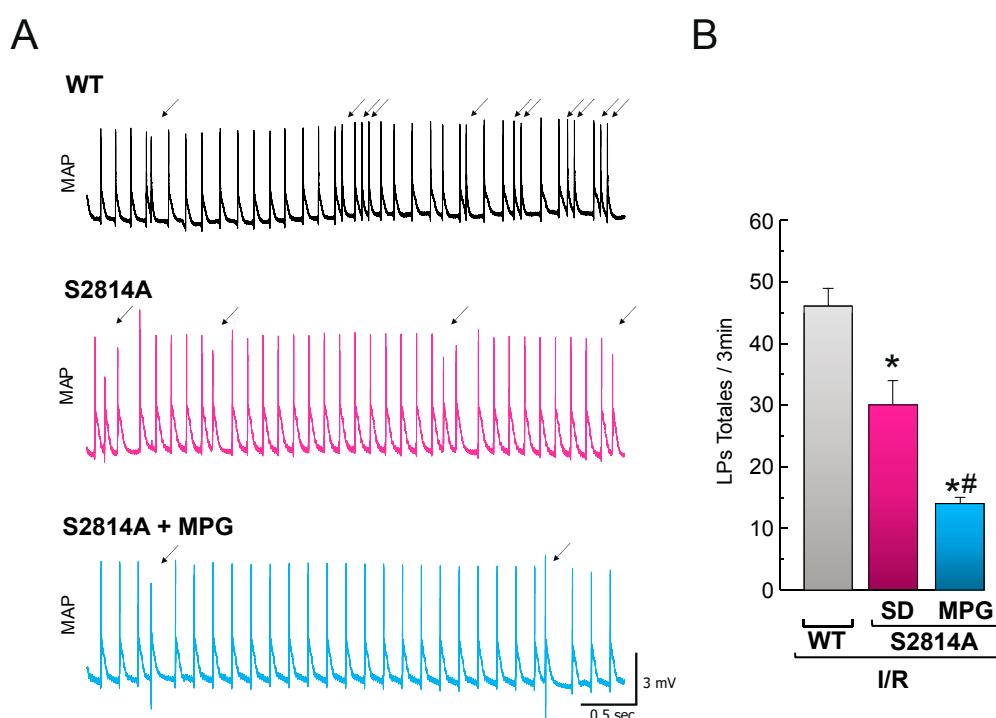


Figura 44. Arritmias de reperfusión en ratones S2814A. A) Registros representativos de la actividad eléctrica (MAP) que muestran LPs (flechas) durante la reperfusión en ratones WT o con mutación genética del sitio Ser2814 del RyR2 (S2814A) en ausencia (SD) o presencia de MPG. B) Resultados totales de LPs durante los primeros 3 min de reperfusión. Los datos representan la media ± SE (n=3-8 corazones). *p<0,05 respecto a WT. #p<0,05 respecto a S2814A sin MPG.

Como se muestra en la Figura 44, los ratones S2814A sometidos a I/R mostraron una disminución significativa de los LPs al inicio de la reperfusión respecto a los contabilizados en la cepa salvaje (WT), avalando resultados previos de nuestro grupo (Said y col. 2011). El tratamiento con MPG fue capaz de reducir aún más la incidencia de arritmias en los ratones transgénicos.

4.2. Contribución de la fosforilación y oxidación del RyR2 a las pérdidas espontáneas de Ca^{2+} del RS en miocitos aislados sometidos a I/R

Si bien nuestros resultados sugieren que las modificaciones redox del RyR2 son importantes protagonistas en las arritmias de reperfusión, no pudimos establecer inequívocamente una relación causal. Para poder valorar cómo afectan los cambios redox inducidos por la I/R la actividad del RyR2, estudiamos las pérdidas espontáneas de Ca^{2+} del RS en miocitos aislados de ratones WT y S2814A, sometidos a un protocolo de I/R simulada.

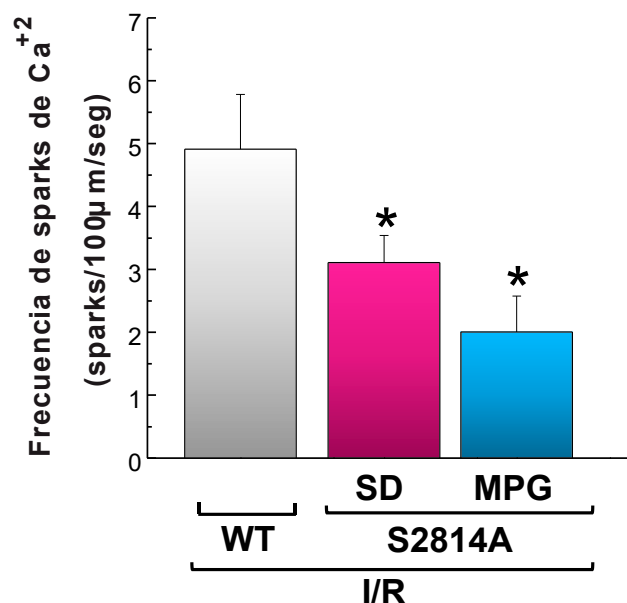


Figura 45. Resultados totales de las liberaciones espontáneas de Ca^{2+} (sparks) por el RyR2 en condiciones Ctrl y durante la I/R en ausencia (SD) y en presencia de MPG. Los datos representan la media \pm SEM (Ctrl vs I/R SD, n=28-41 células de 6 animales). * $P < 0,05$ con respecto a WT.

En miocitos de ratones WT, la I/R provocó un aumento de la frecuencia de chispas de Ca^{2+} respecto a la observada antes del protocolo (Pre-isquemia: $2,2 \pm 0,5$ vs. I/R: $4,9 \pm 0,9$ sparks/100 μ m/seg n=5-10 células de 6 animales, $P < 0,05$). Este

aumento fue significativamente menor en miocitos de ratones S2814A, confirmando que la inhibición genética de la fosforilación del RyR2 reduce la pérdida diastólica de Ca^{2+} del RS (Figura 43). Cuando estos mismos miocitos se trataron con MPG las liberaciones espontáneas de Ca^{2+} disminuyeron aún más.

4.3. Discusión

Los resultados obtenidos en esta sección avalan el concepto de que la oxidación, junto con la fosforilación del RyR2, contribuye a la generación de arritmias de reperfusión. En distintas situaciones experimentales en las que se abolió la fosforilación y/o la oxidación del RyR2, se observó una estrecha correlación entre los eventos arrítmicos y las liberaciones espontáneas de Ca^{2+} por el RS como una medida de la actividad del RyR2. Esto nos permite sugerir que las alteraciones post-traduccionales del canal son mecanismos moleculares responsables de las arritmias de reperfusión. Es decir que tanto la fosforilación como la oxidación actuarían de manera conjunta regulando la actividad del canal y generando un escenario posible para la aparición de arritmias durante la reperfusión.

Como fue ya descrito, numerosos trabajos habían demostrado de manera independiente que la fosforilación por CaMKII y la oxidación del RyR2 favorecen la generación de arritmias en distintas patologías (Chelu y col. 2009; Ho y col. 2011; Belevych y col. 2011; Bell y col. 2015). Recientemente se ha descrito que podría existir una potencial interacción y/o relación entre ambas modificaciones postraduccionales del RyR2. En un modelo murino con distrofia muscular de Duchenne (*mdx*) (Kyrychenko y col. 2013; Wang y col. 2015) la inhibición genética de la fosforilación del canal, disminuyó la oxidación y actividad del RyR2 encontradas en la cardiomiopatía de esta enfermedad. En contraste, en corazones intactos de cobayo se encontró que la inhibición de la S-nitrosilación del RyR2, provocó un aumento de su oxidación e incrementó las arritmias provocadas por la elevación del Ca^{2+} intracelular pero esto se acompañó de una disminución de la fosforilación del sitio serina 2814 del RyR2 (Cutler y col. 2012). Estas interacciones entre las modificaciones oxidativas y la fosforilación del RyR2 no se observaron en nuestros experimentos de corazones sometidos a I/R. La disminución de la oxidación del RyR2 por el tratamiento con MPG no afectó el aumento en la fosforilación dependiente de CaMKII del RyR2 inducido por la reperfusión. Los resultados demuestran que en nuestras condiciones experimentales, la oxidación y

la fosforilación actúan como vías independientes y aditivas en la regulación de la actividad del RyR2 y la propensión a la aparición de arritmias.

Recientemente, se han comenzado a estudiar los cambios que la fosforilación y oxidación introducen en la estructura del RyR2, cambios que podrían explicar la mayor pérdida de Ca^{2+} por favorecer la inestabilidad del canal. Se sugiere que tanto la oxidación del canal como su fosforilación por CaMKII, alteran la interacción de los dominios N-terminal y central llevando a un cambio conformacional con menor afinidad por la CaM (Oda y col. 2015; Uchinomi y col. 2016), proteína que unida al canal lo hace más estable e inhibe el influjo de Ca^{2+} (Yamaguchi y col. 2003)

A partir de estos resultados, proyectamos profundizar el estudio de la relación entre alteraciones post-traduccionales del RyR2 y la aparición de arritmias en la I/R. En un futuro próximo investigaremos si drogas como el dantrolene, que se ha propuesto revierte las alteraciones estructurales provocadas por la fosforilación y la oxidación que inestabilizan al canal (Oda y col. 2015; Uchinomi y col. 2016; Bers 2017), tiene un efecto beneficioso sobre la arritmogénesis que ocurre en la I/R.

CONCLUSIONES



En resumen, nuestros resultados aportan evidencias que amplían el conocimiento sobre los potenciales mecanismos subcelulares que conducen a las arritmias de reperfusión. Pudimos comprobar que el estrés oxidativo contribuye a la alteración del ritmo cardíaco en un modelo de I/R en corazón aislado. Demostramos la presencia de modificaciones redox tanto en CaMKII como en el RyR2 durante la reperfusión postisquémica. Evidenciamos que las oxidaciones reversibles del RyR2 como la S-nitrosilación y la S-glutathionilación restringen las arritmias (oxidaciones protectoras), mientras que otras oxidaciones amplifican el efecto arritmogénico de la fosforilación del canal debida a CaMKII. En miocitos aislados, pudimos demostrar que las alteraciones redox del RyR2, junto con su fosforilación por CaMKII, aumentan la actividad del canal, generando un escenario propicio para las arritmias de reperfusión.

Los resultados de este trabajo de Tesis permitirían suponer que las estrategias farmacológicas y no farmacológicas que intentan reducir el estrés oxidativo causado por la I/R, podrían ser una terapéutica apropiada en las arritmias de reperfusión. Sin embargo, diversos estudios clínicos han revelado que la terapia antioxidante en este contexto no ha dado los resultados esperados (Lonborg 2015; Sinning y col. 2017; Farías y col. 2017). La limitación de estos tratamientos radicaría entre otras razones, en la falta de identificación de las fuentes de producción de ROS/RNS y/o en la incapacidad de dirigir los antioxidantes hacia los compartimentos subcelulares adecuados.

Esperamos que este trabajo experimental contribuya a aclarar las bases moleculares del fenómeno arritmico permitiendo una mejor implementación de la terapia antioxidante con el fin de resolver esta complicación frecuente de la reperfusión coronaria, la cual, por su severidad, pone en riesgo la vida de los pacientes con infarto de miocardio, enfermedad con una alta prevalencia en nuestro país y en el mundo.

BIBLIOGRAFÍA



- Adachi T**, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, Cohen RA. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med.* 2004; 10(11): 1200-1207.
- Ai X**, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ Res.* 2005; 97: 1314-22.
- Algenstaedt P**, Antonetti DA, Yaffe MB, Kahn CR. Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca^{2+} -ATPases in muscle and heart. *J Biol Chem* 1997; 272: 23696-23702.
- Anderson ME**. Multiple downstream proarrhythmic targets for calmodulin kinase II: Moving beyond an ion channel-centric focus. *Cardiovasc Res.* 2007; 73:657-666.
- Akin BL, Jones LR**. Characterizing phospholamban to sarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA2a) protein binding interactions in human cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles using chemical cross-linking. *J Biol Chem.* 2012 Mar 2; 287(10): 7582-7593.
- Baczkó I**, Giles W, Light P. Resting Membrane Potential Regulates Na^{+} - Ca^{2+} Exchange-Mediated Ca^{2+} overload during hypoxia–reoxygenation in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 2003; 550(Pt 3): 889–898.
- Baddeley D**, Jayasinghe ID, Lam L, Rossberger S, Cannell MB, Soeller C. Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor distribution in rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 22275-22280.
- Balshaw DM**, Yamaguchi N y Meissner G. Modulation of intra-cellular calcium-release channels by calmodulin. *J. Membr. Biol.* 2002; 185: 1-8.
- Batthyány C**, Bartesaghi S, Mastrogiovanni M, Lima A, Demicheli V, Rad R. Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects. *Antioxid Redox Signal.* 2017; 26(7): 313-328.
- Bassani RA**, Bassani JW, Bers DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol.* 1992, 453: 591-608.
- Belevych AE**, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y, Wilson LD, Cardounel AJ, Laurita KR, Carnes CA, Billman GE, Gyorke S. Redox modification of ryanodine receptors underlies calcium alternans in a canine model of sudden cardiac death. *Cardiovasc Res.* 2009; 84(3): 387-395.
- Belevych AE**, Terentyev D, Terentyeva R, Nishijima Y, Sridhar A, Hamlin RL, Carnes CA, Györke S. The relationship between arrhythmogenesis and impaired contractility in heart failure: Role of altered ryanodine receptor function. *Cardiovasc Res* 2011. 90: 493-502.
- Belevych AE**, Radwański PB, Carnes CA, Györke S. 'Ryanopathy': causes and manifestations of RyR2 dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2013; 98(2):240-247.
- Bell JR**, Raaijmakers AJ, Curl CL, Reichelt ME, Harding TW, Bei A, Ng DC, Erickson JR, Vila Petroff M, Harrap SB, Delbridge LM. Cardiac CaMKII splice variants exhibit target signaling specificity and confer sex-selective arrhythmogenic actions in the ischemic-reperfused heart. *Int J Cardiol*, 2015.181: 288-296.

- Bencsik P**, Kupai K, Giricz Z, Görbe A, Huliák I, Fürst S, Dux L, Csont T, Jancsó G, Ferdinandy P. Cardiac capsaicin-sensitive sensory nerves regulate myocardial relaxation via S-nitrosylation of SERCA: role of peroxynitrite. *Br J Pharmacol.* 2008; 153(3):488-496.
- Benov L**, Szejnberg L, Fridovich I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25(7): 826-31.
- Bers DM.** Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. 2nd ed. Dordrecht/Boston, MA/London: Kluwer Academic Publishers; 2001.
- Bers DM.** Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature.* 2002; 415: 198-205.
- Bers DM.** Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 380-387.
- Bers DM**, Grandi E. CaMKII regulation of cardiac ion channels. *J Cardio Res.* 2009; 54:180-187
- Bers DM**, Morotti S. Ca²⁺ current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences. *Front Pharmacol.* 2014 Jun 17; 5:144.
- Bers DM.** Stabilizing ryanodine receptor gating quiets arrhythmogenic events in human heart failure and atrial fibrillation. *Heart Rhythm.* 2017; 14(3): 420-421.
- Bolli R**, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 1999; 79:609-34.
- Bolli R**, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. Demonstration of free radical generation in “stunned” myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J. Clin. Invest.* 1988; 82:476-485.
- Braunwald E** y Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 1982; 66(6): 1146-1149.
- Camors E**, Valdivia HH. CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol.* 2014; 5:101.
- Carmeliet E.** Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev.* 1999; 79(3): 917-1017.
- Chelu MG**, Sarma S, Sood S, Wang S, Van Oort RJ, Skapura DG, Li N, Santonastasi M, Müller FU, Schmitz W, Schotten U, Anderson ME, Valderrábano M, Dobrev D, Wehrens XH. Calmodulin kinase II mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest.* 2009; 119: 1940-1951.
- Cheng H**, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* 1993; 262(5134):740-744.
- Chen Z**, Stokes DL, Rice WJ y Jones LR. Spatial and Dynamic Interactions between Phospholamban and the Canine Cardiac Ca²⁺ Pump Revealed with Use of Heterobifunctional Cross-linking Agents. *J Biol Chem.* 2003; 278(48):48348-48356.
- Chouchani ET**, James AM, Fearnley IM, Lilley KS, Murphy MP. Proteomic approaches to the characterization of protein thiol modification. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2011; 15:120-128
- Chung HS**, Wang SB, Venkatraman V, Murray CI, Van Eyk JE. Cysteine Oxidative Post-translational Modifications: Emerging Regulation in the Cardiovascular System. *Circ Res.* 2013; 112(2): 382-392.

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

Cserne Szappanos H, Viola H, Hool L. Molecules in focus L-type calcium channel: Clarifying the “oxygen sensing hypothesis”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2017; 86:32-36.

Curran J, Brown KH, Santiago DJ, Pogwizd S, Bers DM y Shannon TR. Spontaneous Ca²⁺ waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010; 49, 25-32.

Curran J, Tang L, Roof SR, Velmurugan S, Millard A, Shonts S, Wang H, Santiago D, Ahmad U, Perryman M, Bers DM, Mohler PJ, Ziolo MT, Shannon TR. Nitric oxide-dependent activation of CaMKII increases diastolic sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes in response to adrenergic stimulation. *PLoS One.* 2014; 9(2):e87495.

Curtis JM, Hahn WS, Long EK. Protein Carbonylation and Metabolic Control Systems. *Trends Endocrinol Metab.* 2012; 23(8):399-406.

Cutler MJ, Plummer BN, Wan X, Sun QA, Hess D, Liu H, Deschenes I, Rosenbaum DS, Stamler JS, Laurita KR. Aberrant S-nitrosylation mediates calcium-triggered ventricular arrhythmia in the intact heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109: 18186-18191.

Dolphin AC. A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan; 147 (Suppl 1): S56–S62.

Donoso P, Sánchez G. Redox regulation of sarcoplasmic reticulum calcium cycling in the heart. *Physiological mini review, SAFIS.* 2013; Vol. 6 Nro5, ISSN 1669-5410.

Donoso P, Finkelstein JP, Montecinos L, Said M, Sánchez G, Vittone L, Bull R. Stimulation of NOX2 in isolated hearts reversibly sensitizes RyR2 channels to activation by cytoplasmic calcium. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 68: 38-46.

Drago GA, Colyer J. Discrimination between two sites of phosphorylation on adjacent amino acids by phosphorylation site-specific antibodies to phospholamban. *J Biol Chem.* 1994; 269:25073-25077.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82 (1):47-95.

Eisner DA, Trafford AW, Díaz ME, Overend CL, O’Neill SC. The control of Ca²⁺ release from the cardiac sarcoplasmic reticulum: regulation versus autoregulation. *Cardiovasc Res.* 1998; 38: 589-604.

Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O’Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell.* 2008; 133:462-474.

Erickson JR. Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Frontiers in Pharmacology.* 2014; 5:59.

Erickson JR, Nichols CB, Uchinoumi H, Stein ML, Bossuyt J, Bers DM. S-Nitrosylation Induces Both Autonomous Activation and Inhibition of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II δ . *J Biol Chem.* 2015; 290(42):25646-25656.

Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1983; 245(1):C1-14.

- Fang K**, Colecraft HM. Mechanisms of auxiliary beta-subunit-mediated membrane targeting of L-type (Ca^v 1.2) channels. *J Physiol*. 2011; 589:4437-4455.
- Fantinelli J**, González Arbeláez LF, Pérez Núñez IA, Mosca SM. Protective effects of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine against ischemia-reperfusion injury in hypertrophied hearts. *Exp Mol Pathol*. 2013; 94(1):277-284.
- Farías JG**, Molina VM, Carrasco RA, Zepeda AB, Figueroa E, Letelier P, Castillo RL. Antioxidant Therapeutic Strategies for Cardiovascular Conditions Associated with Oxidative Stress. *Nutrients*. 2017; 9(9). pii: E966.
- Farrell EF**, Antaramian A, Rueda A, Gomez AM y Valdivia HH. Sorcin inhibits calcium release and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *J. Biol.Chem*. 2003; 278, 34660–34666.
- Fatai A, Taiwo**. Press Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free electrons. *Spectroscopy*. 2008, 22:491-498.
- Ferrero P**, Said M, Sánchez G, Vittone L, Valverde C, Donoso P, Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C. Ca²⁺/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43:281-291.
- Frank KF**, Bölc B, Erdmann E, Schwinger RH. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc Res*. 2003; 57(1): 20-27.
- Froehlich JP**, Mahaney JE, Keceli G, Pavlos CM, Goldstein R, Redwood AJ, Sumbilla C, Lee DI, Tocchetti CG, Kass DA, Paolocci N, Toscano JP. Phospholamban thiols play a central role in activation of the cardiac muscle sarcoplasmic reticulum calcium pump by nitroxyl. *Biochemistry*. 2008. 16; 47 (50): 13150-13152.
- Gao WD**, Atar D, Backx PH, Marban E. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca²⁺ responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ Res*. 1995; 76(6):1036-10348.
- Garcia-Dorado D**, Piper HM. Postconditioning: Reperfusion of “reperfusion injury” after hibernation. *Cardiovasc Res*. 2006; 69, 1-3.
- Gardner TJ**, Stewart JR, Casale AS, Downey JM, Chambers DE: Reduction of myocardial ischemic injury with oxygen-derived free radical scavengers. *Surgery* 1983; 94: 423.
- George CH**. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure: mere observation or functional relevance? *Cardiovasc. Res*. 2008; 77, 302-314.
- Gill JS**, McKenna WJ, and Camm A. Free radicals irreversibly decrease Ca²⁺ currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol*. 1995; 292: 337-340.
- Gonzalez DR**, Beigi F, Treuer AV, Hare JM. Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 20612-20617.
- Gonzalez DR**, Treuer AV, Castellanos J, Dulce RA, Hare JM. Impaired S-nitrosylation of the ryanodine receptor caused by xanthine oxidase activity contributes to calcium leak in heart failure. *J Biol Chem*. 2010; 285:28938-28945.
- Grek CL**, Zhang J, Manevich Y, Townsend DM, Tew KD. Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation. *J Biol Chem*, 2013; 288: 26497-26504.

- Guo T**, Zhang T, Mestril R y Bers DM. Ca²⁺/Calmodulin dependent Protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ. Res.* 2006; 99, 398-406.
- Gutierrez DA**, Fernandez-Tenorio M, Ogrodnik J y Niggli, E. NO-dependent CaMKII activation during -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovasc. Res.* 2013; 100, 392-401.
- Gyorke I**, Hester N, Jones LR, Györke S. The role of calsequestrin, triadin, and junctinin conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys. J.* 2004; 86, 2121-2128.
- Halling DB**, Parks PA, Hamilton SL. Regulation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels by Calmodulin. *Sci STKE.* 2005; 315: re15.
- Harvey RD**, Hell JW. CaV1.2 signaling complexes in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 58: 143-152.
- Hayashi T**, Martone ME, Yu Z, Thor A, Doi M, Holst MJ, Ellisman MH, Hoshijima M. Three dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca²⁺ signaling in the heart. *J Cell Sci.* 2009; 122:1005-1013.
- Hervé JC**, Derangeon M, Théveniau-Ruissy M, Miquerol L, Sarrouilhe D, Gros D. Connexins and junctional channels. Roles in the spreading of cardiac electrical excitation and heart development. *Pathol Biol (Paris)* 2008; 56(5):334-341.
- Heyndrickx GR**, Millard RW, Mcritchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J. Clin. Invest.* 1975. 56(4):978-985.
- Hidalgo C**, Donoso P, Carrasco MA. The ryanodine receptors Ca²⁺ release channels: Cellular redox sensors? *IUBMB Life.* 2005; 57: 315-322.
- Hill Bradford G**, Ramana KV, Cai J, Bhatnagar A, Srivastava SK. Measurement and identification of S-glutathiolated proteins. *Methods Enzymol.* 2010; 473:179-197.
- Ho HT**, Stevens SCW, Terentyeva R, Carnes CA, Terentyev D and Gyorke S. Arrhythmogenic adverse effects of cardiac glycosides are mediated by redox modification of ryanodine receptors. *J Physiol.* 2011; 589(19): 4697-4708.
- Ho HT**, Belevych AE, Liu B, Bonilla IM, Radwański PB, Kubasov IV, Valdivia HH, Schober K, Carnes CA, Györke S. Muscarinic Stimulation Facilitates Sarcoplasmic Reticulum Ca Release by Modulating Ryanodine Receptor 2 Phosphorylation Through Protein Kinase G and Ca/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Hypertension.* 2016; 68(5):1171-1178.
- Hopkins FG**. Glutathione: Its influence in the oxidation of fats and proteins. *Biochem J.* 1925; 19:787–819.
- Hu H**, Chiamvimonvat N, Yamagishi T, and Marban E. Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ Res.* 1997; 81: 742-752.
- Hudmon A**, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J.* 2002; 364:593-611. Review.
- Huke S**, Bers DM. Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 376(1):80-85.

- Inserte J**, Hernando V, Vilardosa Ú, Abad E, Poncelas-Nozal M, Garcia-Dorado D. Activation of cGMP/protein kinase G pathway in postconditioned myocardium depends on reduced oxidative stress and preserved endothelial nitric oxide synthase coupling. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2(1): e005975.
- Jiang MT**, Lokuta AJ, Farrell EF, Wolff MR, Haworth RA, Valdivia HH. Abnormal Ca²⁺ release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ Res.* 2002; 91(11):1015-1022.
- Kamp TJ**, Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* 2000; 87:1095-1102.
- Kim SJ**, Kudej RK, Yatani A, Kim YK, Takagi G, Honda R, Colantonio DA, Van Eyk JE, Vatner DE, Rasmusson RL, Vatner SF. A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca²⁺ handling. *Circ Res.* 2001; 26; 89(9):831-837.
- Kimura Y**, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH. Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. *J Biol Chem.* 1997; 272(24):15061-15064.
- Kirchberber MA**, Tada M, Katz AM. Phospholamban: a regulatory protein of the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab.* 1975; 5:103-115.
- Kleber AG**, Saffitz JE. Role of the intercalated disc in cardiac propagation and arrhythmogenesis. *Front Physiol.* 2014; 5:404.
- Knyushko TV**, Sharov VS, Williams TD, Schoenich C y Bigelow D. 3-Nitrotyrosine Modification of SERCA2a in the Aging Heart: A Distinct Signature of the Cellular Redox Environment. *Biochemistry* 2005; 44: 13071-13081.
- Köhler AC**, Sag CM, Maier LA. Reactive species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 11-23.
- Kölliker RA von**, Muller H. Nachweis der negativen schwankung des muskel-strom am natürlich sich contrahierenden muskel. *Verh Phys Med Ges.* 1856; 6:528-533.
- Koyama T**, Tawa M, Yamagishi N, Tsubota A, Sawano T, Ohkita M, Matsumura Y. Role of superoxide production in post-ischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat hearts. *Eur J Pharmacol.* 2013; 711(1-3):36-41.
- Kranias EG**, Hajjar RJ. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circulation Research.* 2012; 110: 1646-1660.
- Katz AM**. Discovery of phospholamban. A personal history. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 853:9-19.
- Kyrychenko S**, Poláková E, Kang C, Pocsai K, Ullrich ND, Niggli E, Shirokova N. Hierarchical accumulation of RyR post-translational modifications drives disease progression in dystrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2013; 15: 666-675.
- Kumar V**, Kleffmann T, Hampton MB, Cannell MC, Winterbourn CC. Redox proteomics of thiol proteins in mouse heart during ischemia/reperfusion using ICAT reagents and mass spectrometry. *Free Radic Biol Med.* 2013; 58, 109-117.
- Kushnir A**, Marks AR. The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease. *Adv. Pharmacol.* 2010; 59, 1-30.

- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of acteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.
- Lakireddy V,** Bub G, Baweja P, Syed A, Boutjdir M, El-Sherif N. The kinetics of spontaneous calcium oscillations and arrhythmogenesis in the in vivo heart during ischemia/reperfusion. *Heart Rhythm*. 2006; 3(1): 58-66.
- Lancel S,** Zhang J, Evangelista A, Trucillo MP, Tong X, Siwik DA, Cohen RA, Colucci WS. Nitroxyl activates SERCA in cardiac myocytes via glutathiolation of cysteine 674. *Circ Res*. 2009. Vol 27; 104(6):720-723.
- Landstrom AP,** Dobrev D, Wehrens XH. Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circ Res*. 2017; 120(12):1969-1993.
- Liao R,** Podesser BK, Lim CC. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 303(2): 156-167.
- Lim G,** Venetucci L, Eisner DA, Casadei B. Does nitric oxide modulate cardiac ryanodine receptor function? Implications for excitation-contraction coupling. *Cardiovasc Res*. 2008; 77(2):256-264.
- Leichtweis S,** and Ji LL. Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. *Acta Physiologica Scandinava*. 2001; 172: 1-10.
- Lokuta AJ,** Maertz NA, Meethal SV, Potter KT, Kamp TJ, Valdivia HH, Haworth RA. Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure. *Circulation*. 2005; 111(8):988-995.
- Lønborg JT.** Targeting reperfusion injury in the era of primary percutaneous coronary intervention: hope or hype? *Heart*. 2015; 101(20): 1612-8.
- Luo M,** Anderson ME. Mechanisms of altered Ca²⁺ handling in heart failure. *Circ. Res*. 2013; 113, 690-708.
- Luo M,** Guan X, Luczak ED, Lang D, Kutschke W, Gao Z, Yang J, Glynn P, Sossalla S, Swaminathan PD, Weiss RM, Yang B, Rokita AG, Maier LS, Efimov IR, Hund TJ, Anderson ME. Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII. *J Clin Invest*. 2013; 123: 1262-1274.
- MacLennan DH,** Kimura Y, Toyofuku T. Sites of regulatory interaction between calcium ATPases and phospholamban. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 853:31-42
- Maier LS,** Zhang T, Chen L, Desantiago J, Brown JH, y Bers DM. Transgenic CaMKII delta C overexpression uniquely alters cardiacmyocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ. Res*. 2003; 92:904-911.
- Martínez-Ruiz A,** Lamas S. Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: Convergences and divergences. *Cardiovasc Res*. 2007; 75 (2) 220-228.
- Marx SO,** Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N y col. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 2000; 101:365-376.
- Mayer B,** Pfeiffer S, Leopold E, Schmidt K, Brunner F. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *J Pharmacol*. 1996; 118(6):1433-1440.

Mazurek SR, Bovo E, Zima AV. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release by cytosolic glutathione in rabbit ventricular myocytes. *Free Radic Biol Med.* 2014; 68: 159-167.

McHugh D, Sharp EM, Scheuer T, Catterall WA. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:12334-12338.

Meissner G. Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium.* 2004; 35(6): 621-628.

Mészáros LG. Suppression of spontaneous calcium release events by nitric oxide in rat ventricular myocytes. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004; 25: 604-605.

Ministerio de Salud de la Nación. <http://www.msal.gob.ar>

Mital R, Zhang W, Cai M, Huttinger ZM, Goodman LA, Wheeler DG, Ziolo MT, Dwyer KM, d'Apice AJ, Zweier JL, He G, Cowan PJ, Gumina RJ. Antioxidant network expression abrogates oxidative posttranslational modifications in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300: 1960-1970.

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

Murphy E, Kohr M, Sun J, Nguyen T, Steenbergen C. S-nitrosylation: A radical way to protect the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52: 568-577.

Mustroph J, Maier LS, Wagner S. CaMKII regulation of cardiac K channels. *Front Pharmacol.* 2014; 5:20.

Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, Roberts R. Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation.* 1985; 72(4):915-921.

Niggli E, Ullrich ND, Gutierrez D, Kyrychenko S, Poláková E, Shirokova N. Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca²⁺ signaling and EC-coupling. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 866-875.

Oda T, Yang Y, Uchinoumi H, Thomas DD, Chen-Izu Y, Kato T, Yamamoto T, Yano M, Cornea RL, Bers DM. Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca²⁺ release and pathologically alter, RyR structure and calmodulin affinity. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 85: 240-248.

Olesen C, Picard M, Winther AM, Gyruup C, Morth JP, Oxvig C, Møller JV, Nissen P. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature.* 2007; 450 (7172):1036-1042.

Ortiz GG, Pacheco Moisés FP, Mireles-Ramírez M, Flores-Alvarado LJ, González-Usigli H, Sánchez-González VJ, Sánchez-López AL, Sánchez-Romero L, Díaz-Barba EI, Santoscoy-Gutiérrez JF, Rivero-Moragrega P. Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2017;108:1-31.

Osterrieder W, Brum G, Hescheler W, Trautwein W, Flockerzi V, Hofmann F. Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca²⁺ current. *Nature* 1982; 298:576-578.

- Pérez NG**, Marbán E, Cingolani HE. Preservation of myofilament calcium responsiveness underlies protection against myocardial stunning by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 1999; 42(3):636-643.
- Piper HM**, Meuter K, Schäfer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75(2):S644-8. Review
- Pogwizd SM**, McKenzie JP, Cain ME. Mechanisms underlying spontaneous and induced ventricular arrhythmias in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1998; 98(22): 2404-2414.
- Pogwizd SM**, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res.* 2001; 88: 1159-1167.
- Porzio MA**, Pearson AM. Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 1977; 490: 27-34.
- Picht E.**, Aleksey V. Zima, Lothar A. Blatter, and Donald M. Bers. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293(3): C1073-81.
- Priori SG**, Mantica M, Napolitano C, Schwartz PJ. Early afterdepolarizations induced in vivo by reperfusion of ischemic myocardium. A possible mechanism for reperfusion arrhythmias. *Circulation.* 1990; 81(6): 1911-1920.
- Priori SG**, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danieli GA. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2001; 103(2):196-200.
- Ringer S.** A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol.* 1883; 4(1): 29-42.
- Roos G**, Messens J. Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51:314-326.
- Rueda A**, de Alba-Aguayo DR, Valdivia HH. Ryanodine receptor, calcium leak and arrhythmias. *Arch Cardiol Mex.* 2014; 84(3):191-201.
- Sag CM**, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH, Neef S, Maier SK, Maier LS. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail.* 2009; 2(6):664-675.
- Said M**, Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Ferrero P, Kranias EG, Mattiazzi A. Role of dual-site phospholamban phosphorylation in the stunned heart: insights from phospholamban site-specific mutants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285(3):H1198-1205.
- Said M**, Becerra R, Palomeque J, Rinaldi G, Kaetzel MA, DiazSylvester PL, Copello JA, Dedman JR, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A. Increased intracellular Ca²⁺ and SR Ca²⁺ load contribute to arrhythmias after acidosis in rat heart. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295: 1669-1683.
- Said M**, Becerra R, Valverde CA, Kaetzel MA, Dedman JR, Mundiña-Weilenmann C, Wehrens XH, Vittone L, Mattiazzi A. Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): a main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 51:936-944.

- Sánchez G**, Escobar M, Pedrozo Z, Macho P, Domenech R, Härtel S, Hidalgo C, Donoso P. Exercise and tachycardia increase NADPH oxidase and ryanodine receptor-2 activity: Possible role in cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2008; Res 77: 80-386.
- Sedlak J**, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25: 192-205.
- Schäfer C**, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res.* 2001; 51(2):241-250.
- Shao CH**, Tian C, Ouyang S, Moore CJ, Alomar F, Nemet I, D'Souza A, Nagai R, Kutty S, Rozanski GJ, Ramanadham S, Singh J, Bidasee KR. Carbonylation induces heterogeneity in cardiac ryanodine receptor function in diabetes mellitus. *Mol Pharmacol.* 2012; 82: 383-399.
- Shao D**, Oka S, Brady CD, Haendeler J, Eaton P, Sadoshima J. Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52(3): 550-558.
- Simmerman HK**, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR. Sequence analysis of phospholamban Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem.* 1986; 261:13333-13341.
- Sinning C**, Westermann D, Clemmensen P. Oxidative stress in ischemia and reperfusion: current concepts, novel ideas and future perspectives. *Biomark Med.* 2017; 11(11): 11031-1040.
- Sivakumaran V**, Stanley BA, Tocchetti CG, Ballin JD, Caceres V, Zhou L, Keceli G, Rainer PP, Lee DI, Huke S, Ziolo MT, Kranias EG, Toscano JP, Wilson GM, O'Rourke B, Kass DA, Mahaney JE, Paolocci N. HNO enhances SERCA2a activity and cardiomyocyte function by promoting redox-dependent phospholamban oligomerization. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19(11):1185-1197.
- Slodzinski MK**, Aon MA, and O'Rourke B. (2008). Glutathione oxidation as a trigger of mitochondrial depolarization and oscillation in intact hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 45, pp. 650-660.
- Song YH**, Cho H, Ryu SY, Yoon JY, Park SH, Noh CI, Lee SH, Ho WK. L-type Ca²⁺ channel facilitation mediated by H₂O₂-induced activation of CaMKII in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48: 773-780.
- Stefanska J**, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm.* 2008; 2008: 1–10.
- Stolk J**, Rossie W, Dijkman JH. Apocynin improves the efficacy of secretory leukocyte protease inhibitor in experimental emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150 (6): 1628-1631.
- Tanonaka K**, Iwai T, Motegi K, Takeo S. Effects of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine on mitochondrial function in ischemic-reperfused heart. *Cardiovasc Res.* 2003; 57(2): 416-425.
- Terentyev D**, Györke I, Belevych AE, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y, De Blanco EC, Khanna S, Sen CK, Cardounel AJ, Carnes CA, Györke S. Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in chronic heart failure. *Circ Res.* 2008; 103: 1466-1472.
- Thomas SA**, Fallavollita JA, Lee TC, Feng J, Canty JM Jr. Absence of troponin I degradation or altered sarcoplasmic reticulum uptake protein expression after reversible ischemia in swine. *Circ Res.* 1999; 85 (5): 446-456.

- Uchinoumi H**, Yang Y, Oda T, Li N, Alsina KM, Puglisi JL, Chen-Izu Y, Cornea RL, Wehrens XHT, Bers DM. CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J Mol Cell Cardiol.* 2016; 98:62-72.
- Valverde CA**; Mundiña-Weilenmann C; Reyes M; Kranias EG; Escobar AL; Mattiazzi A. Phospholamban phosphorylation sites enhance the recovery of intracellular Ca²⁺ after perfusion arrest in isolated, perfused mouse heart. *Cardiovasc Res.* 2006; 70 p. 335-345.
- Vandecaetsbeek I**, Raeymaekers L, Wuytack F, Vangheluwe P. Factors controlling the activity of the SERCa pump in the normal and failing heart. *Biofactors* 2009; 35:484-499.
- Vila Petroff M**, Salas MA, Said M, Valverde CA, Sapia L, Portiansky E, Hajjar RJ, Kranias EG, Mundiña-Weilenmann C, Mattiazzi A. CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2007; 73:689-698.
- Vittone L**, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Mattiazzi A. Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34: 39-50.
- Wagner S**, Maier LS. Modulation of cardiac Na⁺ and Ca²⁺ currents by CaM and CaMKII. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006; 17 Suppl 1:S26-S33. Review.
- Wagner S**, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS. Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antiox & Red Sig.* 2013; 18 (9):1063-1077
- Wang H**, Viatchenko-Karpinski S, Sun J, Györke I, Benkusky NA, Kohr MJ, Valdivia HH, Murphy E, Györke S, Ziolo MT. Regulation of myocyte contraction via neuronal nitric oxide synthase: role of ryanodine receptor S-nitrosylation. *J Physiol.* 2010; 588: 2905-2917.
- Wang P**, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem.* 1996; 271(46): 29223-29230.
- Wang Q**, Wang W, Wang G, Rodney GG, Wehrens XH. Crosstalk between RyR2 oxidation and phosphorylation contributes to cardiac dysfunction in mice with Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 89: 177-184.
- Wehrens XH**, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res.* 2004; 94(6):e61-70.
- Wilkins BJ**, Molkenin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322:1178-1191.
- Winslow RL**, Walker MA, Greenstein JL. Modeling calcium regulation of contraction, energetics, signaling, and transcription in the cardiac myocyte. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016; 8 (1):37-67.
- Wit AL**, Janse MJ. Reperfusion arrhythmias and sudden cardiac death: a century of progress toward an understanding of the mechanisms. *Circ Res.* 2001; 89: 741-743.
- Witcher DR**, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 11144–11152.
- World Health Organization (WHO)**. Noncommunicable diseases 2017 (Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>).

- Xiao B**, Jiang MT, Zhao M, Yang D, Sutherland C, Lai FA, Walsh MP, Warltier DC, Cheng H, Chen SR. Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ Res*. 2005; 96(8):847-855.
- Xiao B**, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP. Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase-A activation upon beta-adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem. J*. 2006; 396, 7-16.
- Xiao RP**, Cheng H, Lederer WJ, Suzuki T, Lakatta EG. Dual regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci*. 1994 S27; 91(20):9659-63.
- Xie W**, Santulli G, Reiken SR, Yuan Q, Osborne BW, Chen BX, Marks AR. Mitochondrial oxidative stress promotes atrial fibrillation. *Nature*. 2015; 5:11427.
- Xu A**, Netticadan T, Jones DL, Narayanan N. Serine phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in the intact beating rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 264:241-246.
- Xu L. Eu j**, Meissner G, Stamler J. Activation of cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poli-S-Nitrosilation. *Science*. 1998; 279.
- Yamaguchi N**, Xu L, Pasek DA, Evans KE, Meissner G. Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 2003; 278:23480-23486.
- Yang L J**. Protein redox modifications as a cellular defense mechanism against tissue ischemic injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:343154.
- Yang Y**, Guo T, Oda T, Chakraborty A, Chen L, Uchinoumi H, y col. Cardiac myocyte Z-line calmodulin is mainly RyR2-bound, and reduction is arrhythmogenic and occurs in heart failure. *Circ Res*. 2014; 114, 295-306.
- Yuan W**, Bers DM. Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase Am *J Physiol*. 1994; 267:H982-H993.
- Zalk R**, Lehnart SE, Marks AR. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Ann Rev Biochem*. 2007; 76:367-385.
- Zhang T**, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS. The cardiac specific nuclear delta (B) isoform of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase2A activity. *J Biol Chem*. 2002; 277, 1261-1267.
- Zhang, T**, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J Jr, Bers DM. The delta C isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*. 2003; 92, 912-919.
- Zima AV**, Mazurek SR. Functional impact of ryanodine receptor oxidation on intracellular calcium regulation in the heart. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2016; 171:39-62.
- Ziolo MT**, Katoh H, Bers DM. Expression of inducible nitric oxide synthase depresses beta-adrenergic-stimulated calcium release from the sarcoplasmic reticulum in intact ventricular myocytes. *Circulation* 2001; 104: 2961-2966.
- Zipes DP**. Mechanisms of clinical arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003; 14(8): 902-912.

Zweier JL, Kuppusamy P, Williams R, Rayburn BK, Smith D, Weisfeldt ML, Flaherty JT. Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart. *J Biol Chem*, 1989; 264(32): 18890-18895.