



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***El óxido nítrico como modulador de la
proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} y
calmodulina cardíaca***

Tesista: Lic. BURGOS, Juan Ignacio

Director: Dr. VILA PETROFF, Martín Gerardo

**CENTRO DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES
DR. HORACIO E. CINGOLANI**

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Año: 2018



El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, en el área Ciencias Biológicas, fue realizado en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares - Dr. Horacio E. Cingolani (CIC), de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), bajo la dirección del Dr. Martín Gerardo Vila Petroff.

Mi reconocimiento

A las autoridades actuales del Centro de Investigaciones Cardiovasculares de La Plata, el Dr. Martín Vila Petroff y el Dr. Alejandro Aiello, por haberme abierto las puertas del instituto y permitirme realizar mi trabajo de investigación.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANCyPT), por la Beca Doctoral Tipo I asociada a un proyecto PICT otorgada para realizar inicialmente los experimentos de mi tesis doctoral.

Al CONICET por haberme otorgado la Beca de Finalización de Doctorado Tipo II para poder terminar con el presente trabajo de tesis.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, que me aceptaron en la Carrera de Doctorado, y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB-UNL), que me formó como Licenciado en Biotecnología.

Agradecimientos

Cada persona que pasa por nuestra vida es única. Siempre deja un poco de sí y se lleva un poco de nosotros. Habrá los que se llevarán mucho, pero no habrá de los que no nos dejarán nada. Esa es la prueba evidente de que dos almas no se encuentran por casualidad. A través de este largo camino han pasado muchas personas maravillosas que me han permitido transformar mis desafíos y obstáculos en valiosos aprendizajes, sin las cuales nada de esto hubiese sido posible. Quiero agradecer a quienes me acompañaron durante el doctorado y a lo largo de la vida, que de algún modo aportaron su granito de arena para que esta tesis sea una realidad.

A *mi director*, el Dr. Martín Vila Petrof, no sólo por otorgarme la posibilidad de realizar este trabajo en su laboratorio con total libertad sino también por la confianza que depositó en mí para llevar a cabo este proyecto. Por la experiencia, las enseñanzas y conocimientos que me brindó durante este tiempo. Por su buena predisposición y dedicación, respondiendo cada inquietud y pregunta que se me presentaba. Por sus consejos a nivel científico, sus relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias. Por fomentar el trabajo arduo y la capacitación constante de nuestro grupo. Por hacerme crecer como profesional.

Una especial mención a Ire, una persona más que importante para mí a lo largo de todo este tiempo. Por estar siempre, ya sea participando activamente en este proyecto como desde lo personal, contagiándome su pasión y alegría, guiándome y alentándome en cada momento. Sus considerables contribuciones han conformado lo que es hoy la base fundamental de este trabajo de tesis. Por darme la posibilidad de formar parte de su grupo sin esperar nada a cambio. Por creer en mí y por su inagotable paciencia. Por hacer fácil todo lo difícil. De corazón, ha sido un privilegio contar con vos y te estaré eternamente agradecido.

A *mis compañeros de grupo*. A Luisito, por su generosa amistad, por tanta ayuda en mis primeros pasos en el laboratorio, por transmitirme la pasión por la ciencia, por su buen criterio y entusiasmo, por aconsejarme cuando lo necesité. A Male, por bancarme en todas y escucharme siempre, por sus charlas y largos pero lindos momentos experimentales entre pipetas y cardiomiocitos, y sobre todo por su agradable compañía. A Juli, por su apoyo, sinceridad, risas y por los bonitos momentos que compartimos. A mi compañera de labo, Marisa, por bancarse mis locuras diarias.

A *Alejandra*, con quien hicimos tantos experimentos juntos, nadando a la par de los ratones. Por su compañerismo, por sus consejos y su empuje, por hacer que mi estadía en su labo sea espectacular y dé gusto trabajar de esa manera.

A *Gus*, un viejo y gran amigo que me presentó la ciencia. Por su grandioso humor, por las charlas futboleras, chistes, cuentos y mates sabaleros compartidos. Y a *Celes*, por su ayuda y apoyo incondicional, por escucharme y motivarme siempre. Por haber tenido la suerte de caminar a su lado. Ambos fueron pilares fundamentales en lo personal, haciéndome sentir muchas veces parte de su familia.

A *Moni, Omar y Romi*, mis primeros maestros de laboratorio. Quienes me transmitieron sus conocimientos con una paciencia absoluta, dejándome un sólido cimiento en mis pasos iniciales para el desarrollo de esta la tesis.

A *Ale y Mencho*, por los buenos momentos que compartimos en el labo, dentro y fuera de la cancha. Siendo dos muy buenos amigos.

A *Albita y Ema*, por su cálida compañía. Por levantarme el ánimo cuando las cosas no salían como uno esperaba. Por tantos mates que compartimos. Por el cariño que me transmitieron día a día.

A *Mai*, por su aliento constante. Por escucharme y acompañarme en más de una oportunidad. A *Gi* por la predisposición y motivación que me brindó.

A *personal de apoyo*, quienes cuidaron mis ratones y colaboraron diariamente en este proyecto: Omito, Lofe, Pini, Lean, Pablo, Erica, Lu y Rami.

A *los demás integrantes del CIC*, Alicia, Alex, Orlos, Verito, Chula, Sofi, Romi, Ale, Luisa, Juli, Su, Juli, Mari, Manu, Lu, Sole, Caro, Fer, Dai, Ine, Leti, Mati, Marga, Marian, Barbi, Juani, Clau, Jose, Bernar, Ceci, Nehue, Gaby, Manu, Eri, Mendi, Coty, Ale y Juan, de los cuales he recibido tanto afecto, apoyo, motivación, esperanza y más de una sonrisa.. Por que todos contribuyeron de alguna manera de la presente tesis.

A *mi familia*.. Donde la vida comienza y el amor nunca termina.

A *mis viejos*, Susana y Oscar, por ser mi ejemplo a seguir en la vida. Por ser el motor cuando me quedaba sin cuerda. Por acompañarme en cada paso sin importar lo que pase, apoyándome en cada decisión que he tomado. Por enseñarme que con esfuerzo, dedicación y amor todo se puede. Por que sin ellos no sería la persona que soy hoy y nunca dejan de creer en mí. Por que me enseñaron a luchar contra viento y marea por lo que quiero y sobre todo, a ser feliz..

A *mis hermanos*, Estanislao y Martín, por ser incondicionales e ir juntos a la par. Por ser mi otra mitad, esa que se necesita para superar cada obstáculo por más duro que sea. Por tantos momentos únicos que vivimos, de alegrías y tristezas, de batallas ganadas y unas cuantas perdidas, pero siempre al pie del cañón para lo que sea.

A *mis tíos*, Kity, Bena, Malo, Ani y Gordo, que fueron de gran sostén emocional, que me apoyaron y alentaron para continuar, cuando parecía que me iba a rendir.

A *mis primos*, Lauri, Ale, Ceci, Ariel, Juan, Pitu, Ernestito, Vicky, Vale y Conrado, siendo cada uno muy especial, acompañándome y siguiendo cada uno de mis pasos.

A *mis cuñaditas*, Vero y Belu, por su constante alegría y simpatía, por todo el afecto que me dan y por la cantidad de momentos bonitos que compartimos.

A los *chichipios*, Fran, Jaz, Rami, Cande y Chino, Vicen, Inti y Lihue, Aco, Oli y Sofi. Por el amor que me demuestran día a día. Por las sonrisas cómplices compartidas los fines de semana en la placita. Por esos abrazos sinceros que hacen sentir mucho por dentro. Sin lugar a duda que sin esos locos bajitos no hubiese sido lo mismo.

A *mis abuelas*, Abuti y Uri, por su amor inigualable. Por su lucha y coraje, por inculcarme que no hay que bajar nunca los brazos ni dejar de soñar.

A *Vicky y Fede*, que me acompañaron siempre, haciéndome sentir parte, ayudándome y brindándome lo que necesitara en cada momento.

A *mis amigos del alma*, por compartir risas y fabricar anécdotas. Por los infinitos momentos inolvidables que vivimos y atesoraré siempre. Por que son una parte esencial en mi vida. Por el apoyo incondicional y su enorme cariño. Por que sin ellos no hubiese podido alcanzar mis metas. Más que amigos, son hermanos por elección.

A todos y a cada uno, por ser parte de este momento tan importante en mi vida.. Tarda en llegar y al final hay recompensa.. Gracias de corazón..

ÍNDICE GENERAL

<i>LISTADO DE ABREVIATURAS</i>	10
<i>RESUMEN</i>	14
<i>INTRODUCCIÓN</i>	16
1. La proteína quinasa II dependiente de Ca ²⁺ y calmodulina cardíaca.....	18
1.1. Generalidades sobre la CaMKII.....	18
1.2. Mecanismo de activación de CaMKII.....	21
1.3. Otras formas alternativas de activación.....	22
1.4. La CaMKII en el corazón.....	23
1.4.1. Características generales del acoplamiento éxcito-contráctil.....	23
1.4.2. Rol de CaMKII en condiciones fisiológicas.....	26
1.4.3. Papel de CaMKII en situaciones patológicas.....	30
1.4.4. Impacto de CaMKII sobre la hipertrofia cardíaca.....	32
1.4.5. Papel de CaMKII sobre la adaptación contráctil inducida por ejercicio.....	35
2. Óxido Nítrico.....	37
2.1. Características estructurales y funcionales.....	37
2.2. Biosíntesis de óxido nítrico.....	37
2.3. El óxido nítrico en el tejido cardíaco.....	39
2.3.1. Isoformas de las óxido nítrico sintasas en el corazón.....	39
2.3.2. Vías de señalización intracelular involucradas en la respuesta inotrópica al óxido nítrico.....	40
2.3.2.1. Respuesta contráctil al óxido nítrico derivado de la eNOS.....	43
2.3.2.2. Respuesta contráctil al óxido nítrico derivado de la nNOS	44
2.3.3. Impacto del óxido nítrico sobre la hipertrofia cardíaca.....	46
2.3.4. Rol del óxido nítrico en los efectos cardíacos adaptativos del ejercicio.....	47
3. El óxido nítrico y su vínculo con la CaMKII.....	48
<i>OBJETIVO GENERAL</i>	50
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	52
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	54
1. Aspectos generales.....	55
2. Protocolo de ejercicio en ratones.....	55

3. Análisis ecocardiográfico.....	56
4. Estudios histológicos.....	57
5. Aislamiento de cardiomiocitos de ratón.....	58
6. Transitorios de Ca^{2+} y medidas de acortamiento celular.....	60
7. Estimación del contenido luminal de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático.....	62
8. Medición de la producción intracelular de óxido nítrico.....	62
9. Corazones perfundidos de ratón.....	63
10. Inmunodetección por análisis de Western blot.....	64
11. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real.....	65
12. Reactivos y drogas.....	66
13. Análisis estadístico.....	66
RESULTADOS.....	67
1. El IGF-1 produce un efecto inotrópico y lusitrópico positivo por un mecanismo dependiente de óxido nítrico y CaMKII en cardiomiocitos ventriculares aislados de ratón.....	68
2. El IGF-1 estimula la producción de óxido nítrico por nNOS de manera independiente de CaMKII.....	72
3. Vía de señalización intracelular inducida por IGF-1 en corazones perfundidos de ratón.....	74
4. Rol crítico de CaMKII en la respuesta contráctil inducida por IGF-1 en cardiomiocitos de ratones transgénicos.....	79
5. El IGF-1 aumenta el contenido de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático y la amplitud y velocidad de relajación del transitorio de Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados de ratón.....	81
6. El papel de CaMKII en la adaptación cardíaca al ejercicio físico aeróbico en ratones sometidos a una rutina de natación.....	83
DISCUSIÓN.....	91
1. El IGF-1 produce un EIP y ELP por un mecanismo dependiente de óxido nítrico y CaMKII en cardiomiocitos ventriculares aislados de ratón.....	93
2. El IGF-1 estimula la producción de óxido nítrico por nNOS de manera independiente de CaMKII.....	95
3. Vía de señalización intracelular inducida por IGF-1 en corazones perfundidos de ratón.....	96

4. El IGF-1 aumenta el contenido de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático que resulta en un aumento en el transitorio de Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados de ratón.....	97
5. El papel de CaMKII en la adaptación cardíaca al ejercicio físico aeróbico en ratones sometidos a una rutina de natación.....	99
<i>CONCLUSIONES</i>	102
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	105
<i>LISTADO DE FIGURAS</i>	130

LISTADO DE ABREVIATURAS

- α -AR:** receptor alfa adrenérgico
- AC:** adenilato ciclasa
- AC3-C:** ratón transgénico que expresa un péptido desordenado del inhibidor de la CaMKII derivado de autocamtida3
- AC3-I:** ratón transgénico que expresa un péptido inhibidor específico de CaMKII derivado de autocamtida 3
- AG-1024:** tyrfostina (antagonista del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1)
- AM:** éster de acetoximetilo
- AEC:** acoplamiento éxico-contráctil
- AKT:** proteína quinasa B
- AMPc:** adenosín monofosfato cíclico
- ANP:** péptido natriurético tipo A o atrial
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- ATP:** adenosín trifosfato
- β -AR:** receptor beta adrenérgico
- β -MHC:** cadena pesada de la beta-miosina
- BNP:** péptido natriurético tipo B o cerebral
- C57BL/6:** C57 o ratón silvestre (WT)
- Ca²⁺:** calcio
- Ca²⁺_i:** calcio intracelular
- Ca²⁺-CaM:** complejo calcio-calmodulina
- CaMKII:** proteína quinasa 2 dependiente de calcio-calmodulina
- COOH:** extremo C terminal (C-term)
- CO₂:** dióxido de carbono
- Cl₂Ca:** cloruro de calcio
- Cl₂Mg:** cloruro de magnesio
- KCl:** cloruro de potasio
- ClNa:** cloruro de sodio
- DADs:** post despolarizaciones tardías
- DAF-FM:** diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (indicador de la producción intracelular de óxido nítrico)
- DDVI:** diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- DSVI:** diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo
- DPHR:** receptores de dihidropiridinas o canales de calcio de tipo L
- e⁻:** electrones
- EADs:** post despolarizaciones tempranas
- EDTA:** etilendiaminotetracético
- EGTA:** ácido etilenglicol tetracético (agente quelante de calcio)
- EIN:** efecto inotrópico negativo
- EIP:** efecto inotrópico positivo
- ELN:** efecto lusitrópico negativo
- ELP:** efecto lusitrópico positivo
- eNOS:** óxido nítrico sintasa endotelial (o NOS3)
- EPAC:** proteína de intercambio directamente activada por adenosín monofosfato cíclico
- ET-1:** receptor de endotelina 1
- ERK 1/2:** quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2
- FA:** fracción de acortamiento
- FAD:** flavín adenosín dinucleótido
- FMN:** flavín mononucleótido
- FURA-2:** ácido aminopolicarboxílico
- g:** gramos
- GAPDH:** gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- GPCR:** receptor acoplado a proteína G

GMPc: guanosín-3', 5'-monofostato cíclico	LCIC: liberación de calcio inducida por calcio
GSNO: S-nitrosoglutation	LT: longitud de la tibia
H₂O₂: peróxido de hidrógeno	LTCC: canales de calcio de tipo L (receptores de dihidropiridinas)
H₂PO₄Na: fosfato monobásico de sodio	MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos
HC: hipertrofia cardíaca	MyBP-C: proteína C de unión a miosina
HCO₃Na: bicarbonato de sodio	MEF-2: factor potenciador 2 específico de miocito
HCl: ácido clorhídrico	MK-2206: dihidrocloruro (inhibidor de la proteína quinasa B)
HDAC II: histona desacetilasa de clase II	min: minutos
HEPES: solución buffer que contiene principalmente ácido hidroxietil-piperazinetano-sulfónico	ml: mililitros
Hz: hercios o hertz	mM: milimolar
IC: insuficiencia cardíaca	mm: milímetro
ICa_L: corriente de facilitación de calcio de tipo L	mmHg: milímetro de mercurio
IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1	MsrA: metionina sulfóxido reductasa A
IGF-1R: receptor del factor de crecimiento de tipo 1	MVI: masa ventricular izquierda
IP₃: inositol trifosfato	n: número de células cardíacas
IM: infarto del miocardio	nM: nanomolar
IMVI: índice de masa ventricular izquierda	N: número de corazones
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible (o NOS2)	Na²⁺: sodio
I/R: isquemia y reperfusión	NaOH: hidróxido de sodio
JNK: quinasas del amino terminal de la proteína c-JUN	Nad: grupo de ratones nadadores
K⁺: potasio	NAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
KN-93: metoxi-benceno-sulfonamida fosfato (inhibidor selectivo de CaMKII)	NCX: intercambiador sodio/calcio
KN-62: inhibidor selectivo de CaMKII	NFAT: factor nuclear activado por células T
KO: noqueo o inactivación génica	-NH₂: extremo N terminal (N-term)
lat: latidos	NHE-1: intercambiador sodio/protones tipo 1
L-NAME: L-nitroarginina metil éster (inhibidor de las óxido nítrico sintasas)	NG: nitroguanidina (inhibidor específico de óxido nítrico sintasa neuronal)
	nM: nanomolar

NO: óxido nítrico	Sed: grupo de ratones sedentarios
NOS: óxido nítrico sintasas	seg: segundos
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal (o NOS1)	SEM: error estándar
O₂: oxígeno	SERCA2a: bomba de calcio ATPasa del retículo sarcoplasmático
O₂⁻: superóxido	Ser16: serina 16
ONOO⁻: peroxinitritos	Ser2814: serina 2814
O-GlcNAc: O-Glucosil-N-Acetilación	S-NO: S-Nitrosilación
PA: potencial de acción	SH: grupos tioles
PBS: buffer fosfato salino	SHR: ratas espontáneamente hipertensas
PC: peso del corazón	SNAP: S-nitroso-N-acetylpenicillamina (donante de óxido nítrico)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	SO₄Mg: sulfato de magnesio
PDE: fosfodiesterasa	STC: sección transversal de los cardiomiocitos
Phe: fenilefrina	t_{1/2}: tiempo a la mitad de la relajación
PKA: proteína quinasa A	TAC: contricción aórtica transversal
PKC: proteína quinasa C	TBS: solución salina tamponada con Tris
PKG: proteína quinasa G	Thr17: treonina 17
PMCA: bomba de calcio ATPasa de membrana	TIVd: espesor diastólico del tabique interventricular
PMSF: fluoruro de fenil-metil-sulfonilo	TIVs: espesor sistólico del tabique interventricular
PLN: fosfolamban	TnC: troponina C
PPD: espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole	TnI: troponina I
PPS: espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en sístole	TnT: troponina T
PVDF: membranas de difluoruro de polivinilideno	Tm: tropomiosina
RS: retículo sarcoplasmático	Tween 20: polisorbato 20
RT: retrotranscripción	μM: micromolar
ROS: especies reactivas de oxígeno	UA: unidades arbitrarias
rpm: revoluciones por minuto	V: Voltios
RYR2: receptores cardiacos de rianodina de tipo 2 o canales de Ca ²⁺ del retículo sarcoplasmático	VI: ventrículo izquierdo
SDS: dodecilsulfato sódico	WB: inmunodetección o Western Blott
	WT: wild-type o ratón silvestre

RESUMEN

El presente trabajo de tesis tuvo como finalidad estudiar la interacción de la quinasa II dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina (CaMKII) y del Óxido Nítrico (NO) en la adaptación contráctil y la hipertrofia cardíaca (HC) asociada con el ejercicio.

La adaptación del corazón al entrenamiento aeróbico sostenido incluye una mejora en la contractilidad y un aumento en la masa cardíaca, mediante un mecanismo que hasta el momento no ha sido completamente dilucidado. Dado que actualmente se conoce que el IGF-1 es el principal mediador de la respuesta adaptativa al ejercicio, y el NO y la CaMKII son reconocidos reguladores de la contractilidad y la HC, se exploró si estas moléculas de señalización participan en la adaptación cardíaca fisiológica al ejercicio inducida por IGF-1. Para ello, se trabajó con un modelo celular de cardiomiocitos aislados de ratón expuestos a IGF-1 y con ratones sometidos a una rutina de ejercicio por natación.

Los resultados presentados en esta tesis, muestran que el IGF-1 administrado de manera exógena y en forma aguda, produce un efecto inotrópico y lusitrópico positivo (EIP y ELP) en cardiomiocitos aislados de ratón adulto. Este efecto, se puede cancelar tanto por la inhibición de la síntesis de NO con L-NAME, como por la inhibición selectiva de CaMKII con KN-93. Además, sugieren que el IGF-1 aumenta la producción de NO y éste activa a la CaMKII que, a su vez, a través de la fosforilación de sustratos específicos involucrados en el manejo de Ca^{2+}_i , sería la responsable del aumento en la contractilidad inducida por IGF-1.

Los resultados alcanzados en cardiomiocitos aislados concuerdan con los obtenidos en el modelo de ejercicio, en el que ratones que expresan en el corazón un péptido inhibidor de CaMKII (AC3-I), se sometieron a un protocolo de natación. Los ratones AC3-I ejercitados desarrollaron HC fisiológica aún en ausencia de activación de CaMKII. Sin embargo, y tal como se esperaba, no mostraron una mejora en la función contráctil como sí fue evidenciada en los animales controles (AC3-C) sujetos al mismo período de entrenamiento.

Tomados en conjunto, estos resultados permiten concluir que la activación de CaMKII dependiente de NO desempeña un papel crítico en el EIP y ELP del IGF-1 y, por lo tanto, en el aumento adaptativo de la contractilidad asociado al entrenamiento físico regular. Sin embargo, el eje NO/CaMKII no tiene participación en la respuesta hipertrófica asociada con el ejercicio.

INTRODUCCIÓN

En respuesta a situaciones de sobrecarga hemodinámica, de presión o volumen, el corazón se adapta e induce el remodelado ventricular, principalmente a expensas del aumento del tamaño de los cardiomiocitos. A esta condición se la denomina hipertrofia cardíaca (HC) y se la define como un aumento de la masa cardíaca. La HC puede clasificarse en fisiológica o patológica según la situación que desencadene su desarrollo. Algunas HC se acompañan de aumento de fibrosis intersticial, mayor incidencia de apoptosis y reprogramación de la expresión génica de genes fetales (Chien KR 1999, McKinsey TA y Olson EN 1999, van Empel VP y De Wind LJ 2004). Estas alteraciones en la estructura del miocardio se asocian con el deterioro de la función ventricular evolucionando habitualmente a insuficiencia cardíaca (IC), en lo que se conoce como HC patológica. Por otra parte, la HC evidenciada en individuos que realizan entrenamiento físico intenso (“corazón del atleta”) o durante el embarazo, se denomina HC fisiológica. Este tipo de HC constituye una respuesta adaptativa y reversible del miocardio que tiende a mantener o aún mejorar la función contráctil frente a la mayor demanda. Si bien la HC fisiológica y la patológica en etapas tempranas de su desarrollo parecen compartir un mismo fenotipo (aumento de la masa cardíaca), las evidencias sustentan que se trata de dos entidades independientes, con diferencias estructurales, metabólicas y a nivel molecular, incluidas las vías de señalización intracelular gatilladas (Heineke J y Molkentin JD, 2006).

La HC fisiológica cursa con un aumento de las concentraciones plasmáticas y cardíacas del factor de crecimiento insulínico tipo I o IGF-1 (Hunter JJ y Chien KR 1999, van Empel VP y De Wind LJ 2004). Sus efectos pro-hipertróficos dependen de la activación del receptor de IGF-1 (IGF-1R) con actividad tirosina quinasa intrínseca, fundamentalmente a expensas de la activación de la cascada de señalización mediada por las vías PI3K/AKT y MAPK, estimulando la síntesis proteica y el crecimiento celular (Foncea R y col. 1997, Troncoso R y col. 2013). Además, el IGF-1 es crucial en el aumento de la contractilidad cardíaca asociado a la activación de AKT (Freestone NS y col. 1996, Kim SJ y col. 2008, Ellison GM y col. 2012). Los ensayos clínicos y experimentales demostraron que el deterioro de la función cardíaca se vincula a bajos niveles circulantes de IGF-1 (Ungvari Z y Csiszar A 2012), destacando el papel de esta hormona en la cardioprotección y su potencial para el tratamiento de diversas patologías cardiovasculares.

Por otra parte, han surgido estudios de diferentes laboratorios que describen la participación de dos moléculas de señalización relevantes, el óxido nítrico (NO, en inglés, *Nitric Oxide*) y la quinasa II dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina (CaMKII) en el remodelado cardíaco y en la adaptación contráctil del miocardio al ejercicio (Kemi OJ y col. 2007, Roof SR y col. 2013, Curran J y col. 2014), las cuales son de principal interés en esta tesis doctoral.

Los antecedentes demuestran que los mismos mecanismos fisiológicos de la célula cardíaca, como el acoplamiento éx cito-contráctil, la contractilidad, la relajación

o la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} , son regulados tanto por CaMKII como por NO (Maier LS y col. 2007, Grandi E y col. 2007, Zhang T y col. 2004, Vila Petroff MG y col. 1999, Vila Petroff MG y col. 2000, Vila Petroff MG y col. 2001). Por otra parte, el NO y la CaMKII, se proponen como las moléculas de señalización más relevantes responsables de la mejora en el manejo de Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i) que conduce al aumento de la contractilidad asociada con el ejercicio. Además, se demostró que al menos en parte, los efectos del IGF-1 son mediados por un incremento en la producción de NO (Ren J y col. 1998); mientras que estudios recientes indican que el IGF-1 puede activar a CaMKII a expensas de un incremento en el Ca^{2+}_i (Carrasco L y col. 2014). Estos antecedentes sugieren una posible interacción funcional entre ambas moléculas en el contexto del entrenamiento aeróbico.

De esta manera, en el presente trabajo de tesis se evaluará el papel del NO y la CaMKII cardíaca en la adaptación funcional y estructural del miocardio en respuesta al tratamiento agudo con IGF-1 exógeno o al ejercicio físico sostenido.

A continuación, se describirán los conceptos básicos necesarios para una mayor y mejor comprensión e interpretación de los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación, que incluyen desde una molécula tan simple como el NO, a una tan compleja como es la CaMKII, y su participación en la fisiopatología de la célula cardíaca.

1. La proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina

1.1. Generalidades sobre la CaMKII

La Calmodulina (CaM, del inglés *Calcium Modulatory protein*) es una proteína con alta afinidad y especificidad por el Ca^{2+} que se activa en respuesta al incremento de Ca^{2+}_i , regulando la actividad de numerosos sustratos, entre ellos, la CaMKII (Clapham DE 2007). La CaM se expresa en forma ubicua en todas las células eucariotas y posee una estructura semejante a una mancuerna, con dos dominios globulares en los extremos, tal como se observa en la figura 1. Cada uno de los dominios cuenta con dos sitios de unión para el Ca^{2+} (Vetter SW y Leclerc E 2003). La gran flexibilidad que presenta la región central de unión, permite a la CaM unirse a más de 300 proteínas diferentes (Yamniuk AP y Vogel HJ 2004).

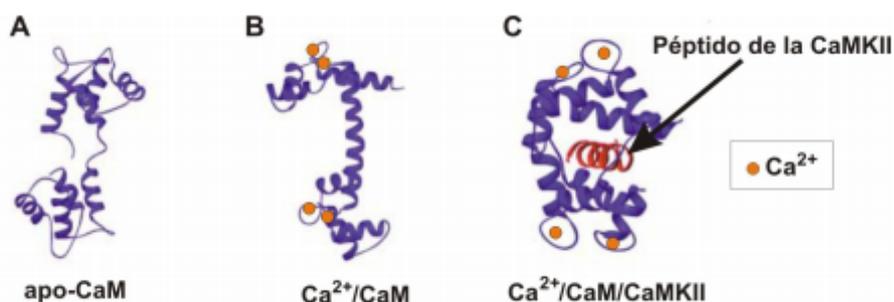


Figura 1. Esquema tridimensional de la CaM y su sitio de unión a CaMKII. (A) En ausencia de Ca^{2+} (libre de ligando o apo-CaM), (B) tras la unión a este ión y (C) luego de la interacción con CaMKII. Modificado de Yamniuk AP y Vogel HJ 2004.

El Ca^{2+} constituye un importante segundo mensajero en el contexto de la fisiología y la fisiopatología cardiovascular. El aumento de Ca^{2+}_i determina, entre otros efectos, la activación de una familia de quinasas dependientes de Ca^{2+} y CaM (CaMKs) que incluye al menos 81 proteínas del proteoma humano (Manning G y col. 2002). Entre ellas, podemos mencionar a las quinasas multifuncionales: CaMKI, CaMKII, y CaMKIV. Las CaMKs son enzimas que catalizan la fosforilación de una amplia gama de proteínas en residuos de serina (Ser) y treonina (Thr), en respuesta al incremento del Ca^{2+}_i y modulan numerosas funciones celulares. Por medio de este mecanismo de regulación reversible a través de fosforilaciones, estas quinasas participan en diversos aspectos de la señalización celular: en la liberación de neurotransmisores, el metabolismo y la expresión génica, y de especial interés para esta tesis doctoral, en el acoplamiento éxcito-contráctil (AEC) del músculo cardíaco (ver más adelante en la sección 1.4.1.) (Tokumitsu H y col. 2000).

En el corazón, se han detectado la CaMKI y la CaMKII. La CaMKI es monomérica, se encuentra en el citoplasma y su rol en el miocardio aún no ha sido dilucidado (Uemura A y col. 1998; Colomer JM y col. 2003). La CaMKII fue la primera descrita entre aquellas quinasas cuya actividad depende del complejo Ca^{2+} -CaM (Schulman H y col. 1978). Es una proteína multimérica constituida por 6 a 12 subunidades, siendo esta última conformación la más frecuentemente expresada en condiciones fisiológicas (Hoelz A y col. 2003). El homododecámero se organiza en dos anillos hexaméricos que se apilan uno encima del otro, formando una estructura circular (Gaertner TR y col. 2004; Braun AP y Schulman H 1995).

Cada subunidad de la CaMKII posee un peso cercano a 50 kDa, de aproximadamente 480 aminoácidos de extensión, en la que se reconocen 3 dominios estructurales con funciones específicas: un dominio de asociación en el extremo carboxilo terminal (C-ter) que permite su oligomerización; un dominio catalítico serina/treonina quinasa correspondiente al extremo amino terminal (N-ter); y un dominio regulatorio en la región media, en donde se encuentra el sitio de unión al complejo Ca^{2+} -CaM ubicado en el segmento auto-inhibitorio (Braun AP y Schulman H

1995; Zhang T y col. 2004). Los monómeros constituyentes se encuentran relacionados entre sí a través del dominio carboxilo terminal (C-term) de asociación, dando lugar al auto-ensamblaje incluso en ausencia de los otros dominios de la enzima (Hoelz A y col. 2003). Además, este dominio podría participar en la interacción con otras proteínas (Hoch B y col. 1999) (figura 2).

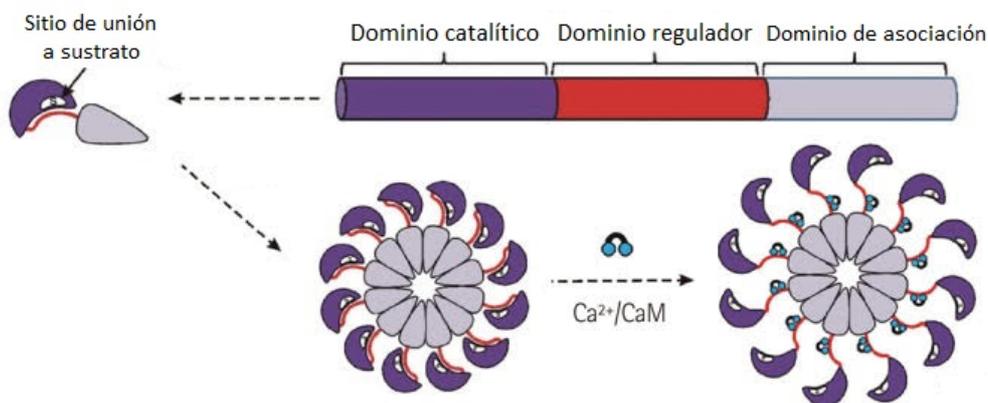


Figura 2. Diagrama de la estructura de la CaMKII. Se muestran los 3 dominios constituyentes del monómero, el sitio de unión a sustrato en la región catalítica y el cambio conformacional mediado por la unión del Ca^{2+} -CaM al dominio regulador. Adaptado de Couchonnal LF y Anderson ME 2008.

Esta holoenzima puede estar constituida por subunidades α , β , δ , y γ , codificadas cada una por distintos genes (Braun AP y Schulman H 1995; Kanaseki T y col. 1991). De las 4 subunidades mencionadas, la α y la β se expresan en cerebro principalmente, donde son importantes para la función nerviosa y la memoria cognitiva, mientras que las demás se encuentran ampliamente distribuidas en múltiples tejidos. Por su parte, varias subunidades presentan variantes de corte y empalme alternativos (splicing), y algunas de ellas, como la δ_B contienen señales que las dirigen al núcleo. Particularmente en el corazón, mediante la técnica de Northern blot, ha sido demostrada la presencia de las subunidades δ y γ (Tobimatsu T y Fujisawa H 1989). La subunidad γ se encuentra en menor proporción en tejido cardíaco, siendo la isoforma δ la predominante en el miocardio de mamíferos, incluido el humano (Hoch B y col. 1999; Maier LS y col. 2002; Backs J y col. 2009). Los roles específicos de estas isoformas de CaMKII en la regulación de la función cardíaca están determinados por su localización subcelular. Actualmente se conoce que la isoforma δ presenta dos variantes de corte principales: la δ_B nuclear, que modula la expresión de genes pro-hipertróficos y la señalización de Ca^{2+} en el núcleo (Mishra S y col. 2011); y la δ_C citosólica, cuya activación aguda se asocia con la fosforilación de proteínas involucradas en el manejo del Ca^{2+}_i (Wehrens XH y col. 2004). En tanto que su activación prolongada se vincula con efectos deletéreos tales como disfunción contráctil, HC patológica, muerte celular y arritmias (Zhang T y Brown JH 2004; Vila Petroff MG y col. 2007; Sag CM y col. 2009).

1.2. Mecanismo de activación de CaMKII

En ausencia del complejo Ca^{2+} -CaM, el dominio catalítico de la quinasa se encuentra inactivo y reprimido por su unión al dominio regulatorio (auto-inhibición). En este dominio auto-inhibidor se halla presente un aminoácido importante en el funcionamiento de la CaMKII, el residuo Thr286/287 (Lai Y y col. 1987). La numeración precisa de este sitio esencial depende de la isoforma.

La vía canónica o clásica de activación de la quinasa involucra la unión del complejo Ca^{2+} -CaM (formado por 4 iones Ca^{2+} unidos a la CaM) al dominio regulatorio de la CaMKII. Esta interacción determina un cambio conformacional que interrumpe la unión auto-inhibitoria, permitiendo que el sitio catalítico se despliegue, y deje libre los sitios para el ATP y el sustrato (Maier LS y col. 2006). Una vez activada, la subunidad puede auto-fosforilar el residuo Thr287 antes mencionado. Esta reacción enzimática es en realidad una trans-fosforilación, en la que cada subunidad es fosforilada por otros monómeros que se encuentran activados en la misma holoenzima (Hanson PI y col. 1994). Si bien esta fosforilación no es esencial para la activación de la quinasa, tiene importantes consecuencias. En primer lugar, aumenta unas 1000 veces la afinidad por el complejo Ca^{2+} -CaM (Meyer T y col. 1992) debido a un cambio conformacional que estabiliza la interacción entre la CaMKII y la CaM (Anderson ME 2007). En segundo lugar, permite una actividad sostenida de CaMKII (en un 20-80%) por auto-fosforilación, aún después de la disociación del complejo Ca^{2+} -CaM al descender los niveles de Ca^{2+} (Griffith LC 2004). De esta manera, inclusive cuando no persista el aumento de Ca^{2+} activador (por ejemplo durante el período diastólico) y el complejo Ca^{2+} -CaM se encuentre disociado del dominio regulatorio, la auto-fosforilación lleva a la enzima al denominado “estado autónomo” (Hudmon A y col. 2002) (figura 3).

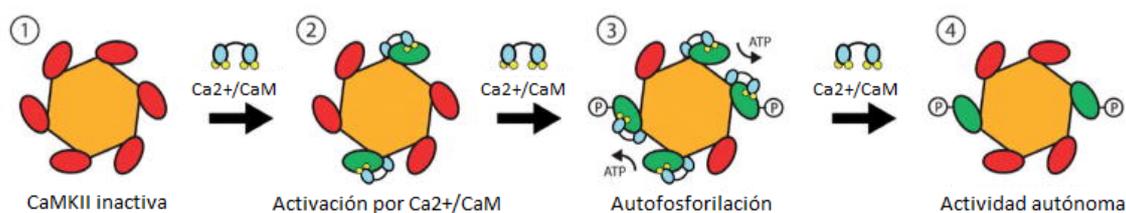


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de auto-regulación de la CaMKII por la interacción con Ca^{2+} -CaM. 1) Unión de Ca^{2+} -CaM 2) Activación de CaMKII por Ca^{2+} -CaM 3) Auto-fosforilación de otros monómeros 4) Estado autónomo de la enzima. Modificado de Swulius MT y Waxham MN 2008.

La disociación del complejo Ca^{2+} -CaM permite la auto-fosforilación de sitios adicionales dentro del dominio regulador de CaMKII: los residuos Thr306 y Thr307. Estas fosforilaciones impiden que vuelva a unirse el complejo Ca^{2+} -CaM en un proceso denominado “sellado” que limita la activación máxima de esta quinasa (Hudmon A y col. 2002). A su vez, la actividad de la enzima se ve limitada cuando el fosfato en Thr287 es removido por acción de fosfatasas tales como PP1, PP2A, PP2C y la CaMKP,

una proteína fosfatasa con especificidad para la familia de CaMK (Ishida A y col. 1998; Zhang T y col. 2004).

1.3. Otras formas alternativas de activación

Las formas descritas de activación a través del complejo Ca^{2+} -CaM y la autofosforilación del residuo Thr287 se conocen hace más de dos décadas. Sin embargo, en los últimos años, nuevos modos de regulación de la actividad de CaMKII por modificaciones post-traduccionales han sido identificados.

En primer lugar, la CaMKII podría mantenerse activa en forma autónoma, aún tras la disociación del complejo Ca^{2+} -CaM, por modificaciones producidas por un incremento en las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*). Las ROS oxidan los aminoácidos metionina en posición 281 y 282 (Met281 y Met282), ubicados en el dominio regulador y muy próximo al sitio de fosforilación Thr287 de CaMKII (Erickson JR y col. 2008; Anderson ME 2015). En un trabajo previo de nuestro laboratorio, de manera consistente con estos resultados, demostramos que CaMKII puede activarse por ROS a concentraciones sub-fisiológicas de Ca^{2+} (Palomeque J y col. 2009). El análisis cristalográfico de la proteína sugiere que la oxidación de la Met282 mantiene activa a la CaMKII, impidiendo la reasociación entre los dominios catalítico y regulador (Rellos P y col. 2010). En tanto, la metionina sulfóxido reductasa A (MsrA) es la enzima responsable de reducir los residuos de metionina oxidados, lo cual permite dar fin a la señalización persistente de CaMKII inducida por ROS (Erickson JR y col. 2008).

Además, se ha descrito que en condiciones de hiperglucemia, la O-GlucosilNAcetilación (O-GlcNAc) del residuo Ser280 catalizada por la enzima O-GlcNAc transferasa, conduce a la activación sostenida de esta quinasa. Este modo de activación no canónica de la CaMKII cobraría relevancia en el contexto de la diabetes. La O-GlcNAc de CaMKII podría desempeñar un papel crítico en el remodelado estructural y eléctrico del corazón del paciente diabético (Erickson JR y col. 2013).

Por otro lado, resulta interesante un primer estudio realizado en tejido nervioso que describe otro potencial mecanismo de regulación de CaMKII α independiente de Ca^{2+} . Este trabajo señala al NO como un potente inhibidor específico de esta quinasa al promover su S-nitrosilación (S-NO), es decir, mediante la conversión de los grupos tiol (-SH) y la formación de S-nitrosotioles en determinados residuos Cys (Song T y col. 2008). Sin embargo, y a diferencia de lo observado en el cerebro, nuevas evidencias describen la posible activación de CaMKII por S-NO en tejido cardíaco (Curran J y col. 2014; Gutierrez DA y col. 2013; Zhang DM y col. 2014; Erickson JR y col. 2014). En una sección posterior, se describirá en mayor detalle la asociación entre ambas moléculas, cuya modulación es el objeto de estudio central de este trabajo de tesis doctoral.

Todos los mecanismos de activación mencionados se han resumido en la figura 4.

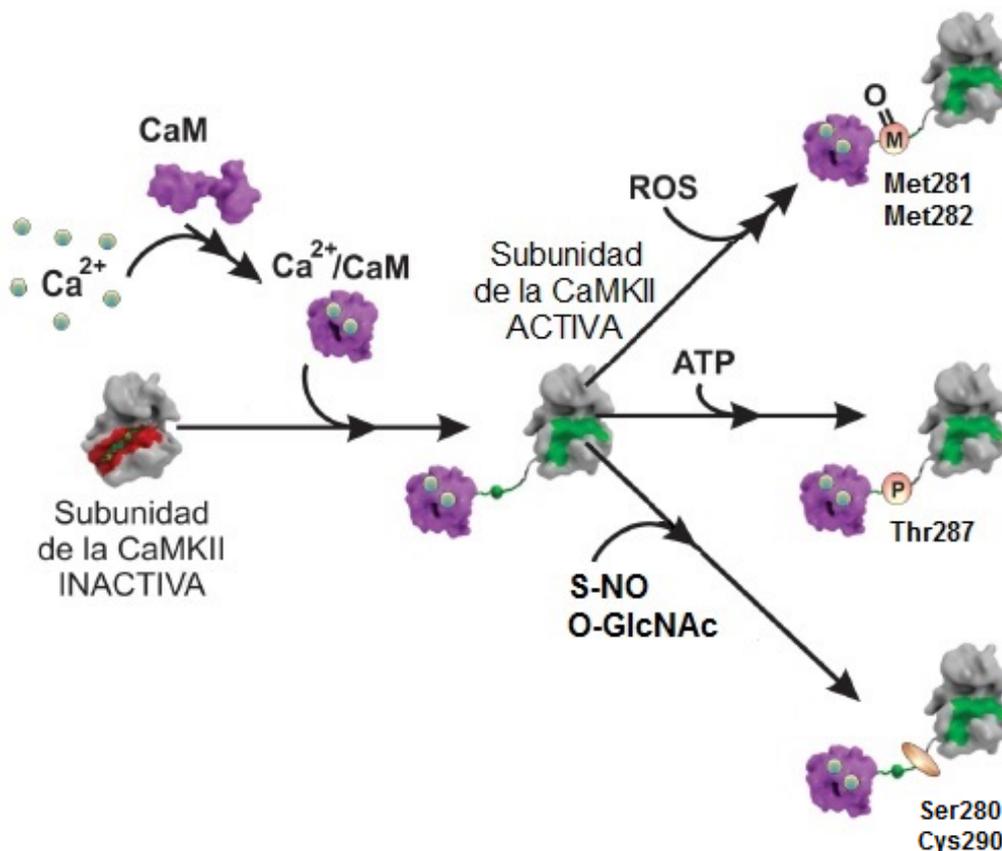


Figura 4. Esquema de los mecanismos de activación propuestos para CaMKII. Con fines explicativos se muestran los posibles mecanismos de activación de una única subunidad de la CaMKII. La forma de activación clásica por medio de la unión del complejo Ca^{2+} -CaM y las modificaciones post-traduccionales que permiten a la enzima mantenerse activa en ausencia de niveles elevados de Ca^{2+} : la fosforilación de Thr287 (ATP), la oxidación por ROS (Met281, Met282), la O-N-acetilglicosilación o O-GlcNAc (Ser280) y la S-nitrosilación o S-NO (Cys290). Adaptado de Rellos P y col. 2010, y de Erickson JR y col. 2014.

1.4. La CaMKII en el corazón

La CaMKII cumple diversas funciones en el corazón. Entre las más estudiadas, se destaca la regulación de mecanismos fisiológicos en el cardiomiocito tales como: el AEC (Maier LS y col. 2007), el fenómeno de la escalera (Valverde C y col. 2005; De Santiago J y col. 2002), el potencial de acción (PA) a través de la modulación de sus corrientes (Grandi E y col. 2007; Erickson JR y col. 2008; Bers DM y Grandi E. 2009), el pH intracelular (Vila Petroff MG y col. 2010) y la transcripción génica (Wu X y col. 2006; Zhang T y col. 2004; Anderson ME y col. 2011).

Para comprender el impacto de CaMKII sobre la función cardíaca y el manejo del ciclado de Ca^{2+}_i , es necesario describir en detalle los mecanismos involucrados en el AEC.

1.4.1. Características generales del acoplamiento éxcito-contráctil

La contracción del cardiomiocito es el resultado de una secuencia de eventos que se inician con un estímulo eléctrico que despolariza la membrana celular y culmina con una respuesta mecánica a nivel de los miofilamentos, fenómeno al que se denomina acoplamiento éxcito contráctil (AEC). La llegada de un PA recorre la membrana plasmática y provoca la entrada de Na^+ a través de los canales rápidos de Na^+ . Con la despolarización, el Ca^{2+} ingresa a los cardiomiocitos a través de canales lentos de Ca^{2+} de tipo L operados por voltaje (LTCC o también llamados receptores de dihidropiridinas), localizados en una región muy especializada de la membrana plasmática conocida como túbulo T, con la consecuente generación de una corriente de Ca^{2+} (I_{CaL}) hacia el interior celular. La entrada de Ca^{2+} por estos canales promueve la liberación de mayor cantidad de Ca^{2+} a través de los receptores de rianodina (RyR2) o canales de Ca^{2+} ubicados en el retículo sarcoplasmático (RS), en un mecanismo denominado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (LCIC del inglés, *Calcium Induced-Calcium Release*). La apertura de los RyR2 amplifica la señal de Ca^{2+} inicial, dando lugar a un aumento transitorio y global del Ca^{2+} citosólico conocido como transitorio de Ca^{2+}_i o *calcium transient* (Fabiato A y Fabiato F 1975). La amplitud de los transitorios de Ca^{2+}_i depende del flujo neto de este ión a través de la membrana plasmática y de su distribución en los distintos compartimentos intracelulares. Al conjunto de procesos que participan en la dinámica del flujo de Ca^{2+}_i , se lo denomina manejo de Ca^{2+}_i .

El aumento en la concentración del Ca^{2+}_i es el responsable de la activación de la maquinaria contráctil, dada por interacción entre las proteínas actina y miosina, que forman parte de unidades estructurales llamadas sarcómeros. Este ión se une entonces a la Troponina C (TnC) produciendo el acortamiento sarcomérico y da lugar a cambios en el complejo regulador Troponina C-Tropomiosina (TnC-Tm) (Bers DM y col. 2002). De esta manera, liberan el bloqueo sobre la actina y permiten la formación de enlaces cruzados actina-miosina, la hidrólisis de ATP y la producción de fuerza contráctil (Jin W y col. 2008). En este sentido, el término Efecto Inotrópico Positivo (EIP) hace referencia al aumento de la capacidad de contracción del miocardio, que depende del número de puentes actina-miosina activos por unidad de tiempo, limitado por la cantidad de Ca^{2+}_i disponible para unirse a la TnC. Por el contrario, el Efecto Inotrópico Negativo (EIN) está dado por una disminución de la contratilidad debido a una menor disponibilidad en el Ca^{2+}_i .

El concepto de AEC también comprende los fenómenos relacionados con la relajación mecánica de los miocitos, lo cual implica la disminución del Ca^{2+}_i . Este descenso en el Ca^{2+} citosólico se produce por: I) fundamentalmente, la retoma hacia el RS a través de la bomba de Ca^{2+} denominada SERCA2a (del inglés, *Sarco-Endoplasmic-Reticulum Ca^{2+} ATPase type 2a*) regulada por la proteína fosfolamban (PLN); II) la extrusión hacia el exterior de la célula por intermedio del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX en inglés, *Sodium-Calcium Exchanger*); III) la bomba de Ca^{2+} ATPasa de membrana

(PMCA) sarcolemal; IV) y la captación mitocondrial (en menor proporción). Durante la relajación o diástole, el Ca^{2+} se disocia de la TnC y es secuestrado por el RS. El complejo TnC-Tm entonces adopta una conformación que vuelve a bloquear la interacción actina-miosina (Bers DM y col. 2002) (figura 5). Como consecuencia de los mecanismos descritos el Ca^{2+}_i oscila normalmente entre 100 nM y 1 μM con cada latido.

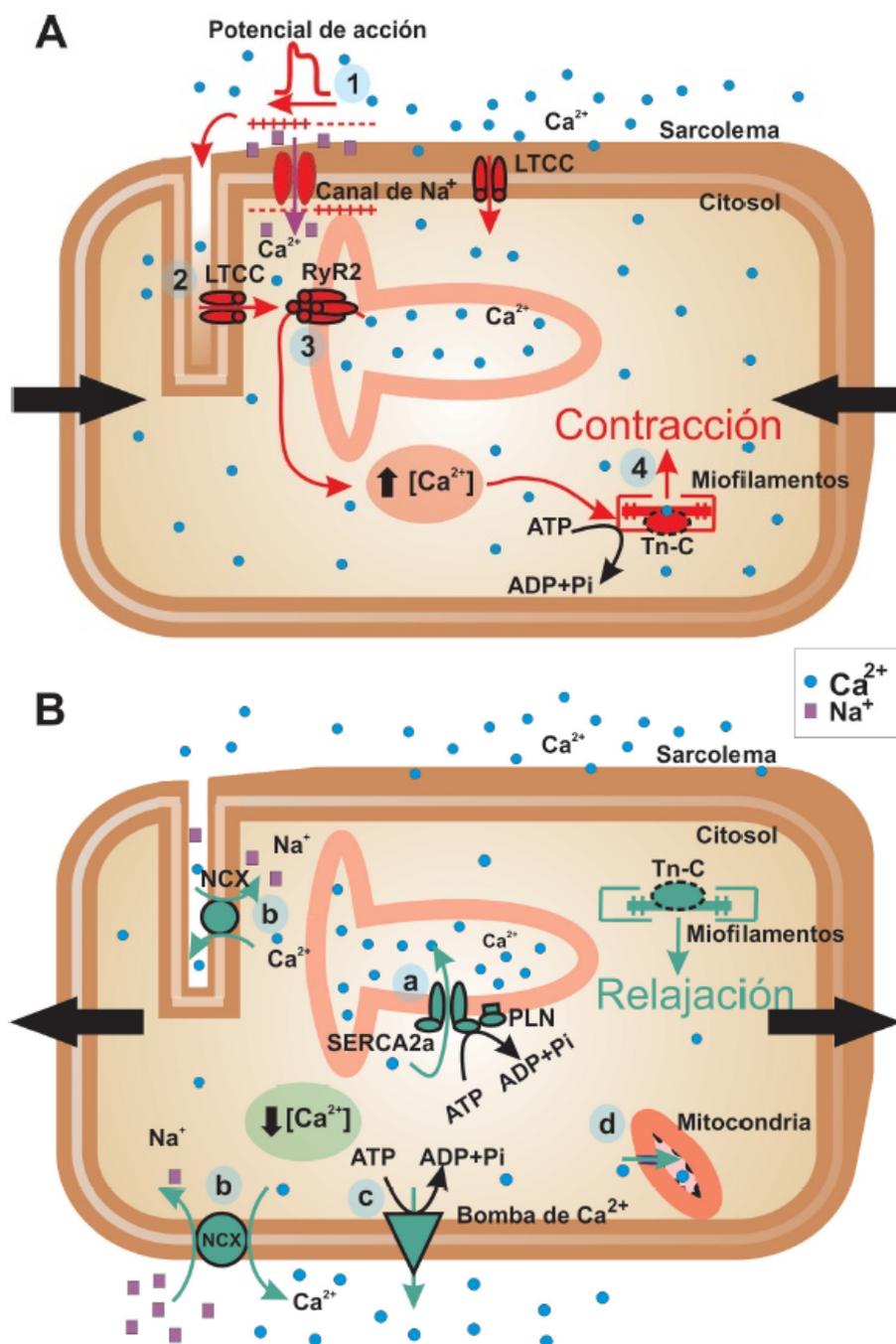


Figura 5. Esquema representativo de los principales eventos intracelulares que se producen durante el AEC. (A) Procesos que intervienen en la contracción (en color rojo): 1) Ingreso de Na^+ y despolarización, 2) Apertura de los LTCC e ingreso de Ca^{2+} , 3) Apertura de los receptores de RyR2 y aumento de Ca^{2+} , 4) Unión del Ca^{2+} a la troponina C (TnC) y contracción muscular; (B) Procesos que intervienen en la relajación (en color verde): a) Recaptura de Ca^{2+} por SERCA2a hacia el RS, b) NCX en su modo directo, c) Ca^{2+} ATPasa de membrana extruyendo Ca^{2+} de la célula y d) Ingreso de Ca^{2+} a la mitocondria.

En este sentido, surge además el término de Efecto Lusitrópico Positivo o ELP, que es el aumento en la velocidad de relajación del miocardio. La proporción en que cada una de las proteínas involucradas en el AEC contribuye al descenso del Ca^{2+}_i ; varía según la especie y las condiciones fisiopatológicas (Bers DM y col. 2006). El principal responsable del acortamiento del período en que se produce la relajación muscular es el RS ya que posee en la membrana a la SERCA2a, con la capacidad de transportar el Ca^{2+} desde el citosol hacia el RS a una velocidad suficiente como para producir la relajación del cardiomiocito. En contraste, el Efecto Lusitrópico Negativo o ELN cursa con una desaceleración de la relajación cardíaca.

Las características del ciclado del Ca^{2+}_i durante el AEC determinan el estado inotrópico y lusitrópico del músculo cardíaco, y sus alteraciones a nivel celular son la causa de diferentes situaciones fisiopatológicas tales como la disfunción contráctil (Bers DM y col. 2006), la HC (Wilkins BJ y Molkentin JD 2004) y las arritmias (Clusin WT 2003).

El secuestro de Ca^{2+} hacia el lumen del RS mediado por SERCA2a se encuentra sujeto a regulación, mediante un mecanismo que depende de la interacción con la PLN. La recaptura de Ca^{2+} resulta inhibida cuando ambas proteínas se encuentran en interacción física de manera reversible (ver a continuación en la sección 1.4.2.) (MacLennan DH y Kranias EG 2003).

En el siguiente apartado se detallarán algunas de las acciones fisiológicas y patológicas más estudiadas en la que participa CaMKII.

1.4.2. Rol de CaMKII en condiciones fisiológicas

Los requerimientos fisiológicos de CaMKII resultan difíciles de discernir ya que tanto ratones transgénicos que tienen deleción de los genes que codifican para la CaMKII δ en el corazón (*knockout* o KO), como ratones que sobreexpresan un péptido inhibitorio de CaMKII a nivel del miocardio (AC3-I), no presentan alteraciones significativas en la función ventricular basal y en los diferentes parámetros del AEC (Zhang R y col. 2005). Sin embargo, estos hallazgos no indican la ausencia de efectos de CaMKII en condiciones fisiológicas, ya que es posible detectar activación de la quinasa (por fosforilación del residuo Thr287) ya sea durante el aumento de la frecuencia cardíaca o de la actividad simpática (Said M y col. 2003; Said M y col. 2002). De este modo, una vez que ha sido activada la enzima, es posible evidenciar claramente el efecto de CaMKII sobre distintos parámetros del AEC.

En las últimas décadas el conocimiento sobre la función de CaMKII a nivel cardíaco ha progresado enormemente, resultando en un mejor entendimiento de su estructura, y su papel fisiológico (Maier y col. 2007). El gran interés en CaMKII deriva en que su actividad depende, al menos en parte de los cambios en el Ca^{2+}_i , de modo que los aumentos sostenidos de Ca^{2+} citosólico que ocurren en diversas situaciones

fisiológicas, pueden activarla. La CaMKII ha sido propuesta como moduladora del efecto inotrópico positivo y relajante, que se producen al aumentar de forma aguda la frecuencia de estimulación (Valverde C y col. 2005; De Santiago J y col. 2002), siendo éste un mecanismo fundamental, conocido como fenómeno de la escalera positiva, que contribuye a la regulación de la contracción y relajación miocárdica en adición al control neuro-endócrino.

Por su parte, esta serina/treonina quinasa modula a través de la fosforilación, varios proteínas o blancos en los cardiomiocitos involucradas en el AEC, incluyendo a los canales de Ca^{2+} del RS o receptores de RyR2 (Ferrero P y col. 2007), los canales de Ca^{2+} tipo L o LTCC (Anderson ME y col. 1994), la PLN (Mundiña-Weilenmann C y col. 1996; Lindemann JP y col. 1985; Simmerman HK y col. 1986) y las proteínas contráctiles (Hamdani N y col. 2013; Tong CW y col. 2004), con múltiples consecuencias funcionales. En general, la fosforilación de estos sustratos aumenta la cinética y la magnitud del transitorio de Ca^{2+} (Maier LS y col. 2007) regulando de manera directa la homeostasis de Ca^{2+}_i . A continuación se describirán los efectos de la fosforilación de CaMKII sobre las distintas proteínas que participan de manera directa en el manejo del Ca^{2+}_i .

La interacción física de CaMKII con el receptor de RyR2 ha sido demostrada (Wehrens XH y col. 2004) y existen varios grupos de investigación que proponen que esta quinasa fosforila fundamentalmente el RyR2 en el residuo Ser2814. Hasta la actualidad, han sido identificados 3 sitios de fosforilación en el RyR2 con relevancia fisiológica: la Ser 2808, que puede ser fosforilada por la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa G (PKG) o la CaMKII; la Ser2814, al parecer un sustrato específico para CaMKII; y la Ser2030, únicamente fosforilada por PKA. Aunque el significado funcional del sitio Ser2814 es discutido, se ha demostrado que su fosforilación incrementa su probabilidad de apertura y promueve la pérdida espontánea de Ca^{2+} desde el RS al citosol (Currie S y col. 2004; Maier LS y col. 2003; Guo T y col 2006). Otras evidencias indican que la fosforilación de este sitio por CaMKII durante la estimulación β - adrenérgica (β -AR) favorece la LCIC, contribuyendo por lo tanto al EIP (Ferrero P y col. 2007). En concordancia, un trabajo reciente reporta un aumento en la probabilidad de apertura del RyR2 durante un registro de corrientes de canal único en ratones que expresan una variante hiperfosforilada en Ser2814 (van Oort y col. 2010).

Adicionalmente se conoce que la función del receptor de RyR2 es afectada por modificaciones post-traduccionales tales como nitrosilación o oxidación de residuos específicos, que junto a los sustratos fosforilables que se encuentran en la cara citosólica, conforman la denominada zona caliente (del inglés, *phosphorylation hot spot*) y su activación aumenta la probabilidad de apertura del canal (figura 6).

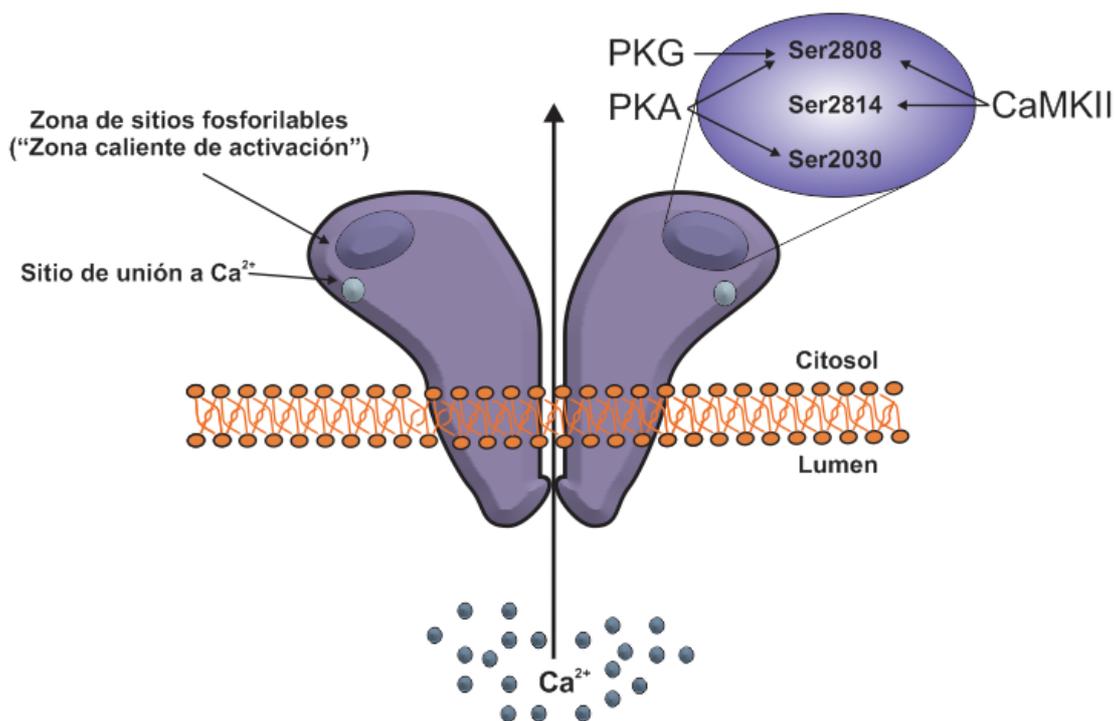


Figura 6. Representación esquemática del receptor de rianodina tipo 2, que incluye ejemplos de su regulación por fosforilación mediada por PKG, PKA y CaMKII. El receptor de RyR2 cuenta con un sitio de unión a Ca^{2+} y presenta 3 sitios de fosforilación: la Ser2808 fosforilable por PKG, PKA y CaMKII; la Ser2814 que exclusivamente se fosforila por CaMKII; y la Ser2030 que puede ser fosforilada por PKA.

La CaMKII puede fosforilar a PLN en el sitio Thr17 (Lindemann JP y col. 1985; Mundiña-Weilenmann C y col. 1996; Ablorh NA y Thomas DD 2015). La actividad de PLN además puede estar regulada por la fosforilación en el residuo Ser16 de manera dependiente de PKA (Mattiuzzi A y Kranias EG 2014). Tal como se observa en la figura 7, esta enzima en su estado desfosforilado y monomérico inhibe a la SERCA2a. En tanto, cuando se fosforila forma pentámeros y se libera dicha inhibición, aumentando la velocidad de recaptura de Ca^{2+} hacia el interior del RS (Brittsan AG y col. 2000). Sin embargo este fenómeno es reversible, dado que cuando PLN se encuentra fosforilada, la interacción entre ambas proteínas es menos estable (MacLennan DH y Kranias EG 2003). La fosforilación de PLN contribuye al efecto relajante o ELP de la estimulación β -AR (Lindenmann J y col 1985; Mundiña-Weilenmann C y col. 1994, Vittone L y col. 1990), y por lo tanto, al aumento del contenido de Ca^{2+} en el RS y al EIP de la estimulación simpática (Said M y col. 2003).

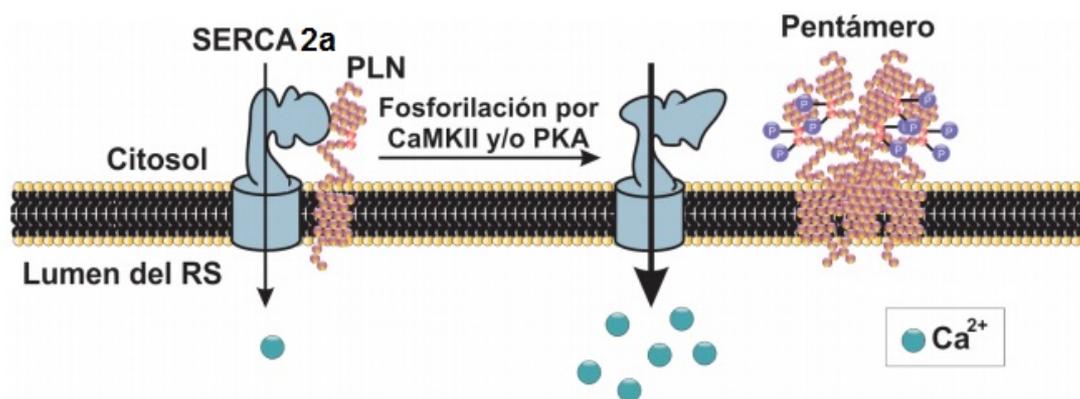


Figura 7. Representación esquemática de la regulación de la SERCA2a por PLN. En su estado monomérico PLN se une a SERCA2a disminuyendo su actividad. La fosforilación de PLN conduce a la formación de pentámeros finalizando el efecto inhibitorio. Adaptado de Kranias EG y col. 2012.

Con respecto a los LTCC, CaMKII activa a la I_{CaL} . Funcionalmente, esta facilitación dependiente de Ca^{2+} consiste en una escalera positiva de I_{CaL} , en la que su amplitud aumenta y retrasa la inactivación de la corriente a lo largo de una serie de pulsos de estimulación (Anderson ME y col. 1994; Hudmon A y col. 2005). Aunque el papel fisiológico de esta fosforilación no está completamente dilucidado, se cree que permite mitigar el efecto inhibitorio directo que ejerce el Ca^{2+} sobre I_{CaL} a altas frecuencias de estimulación (Yuan W y Bers DM 1994). La actividad de CaMKII es importante en la regulación de actividades fisiológicas mediadas por Ca^{2+} , como por ejemplo el mecanismo de respuesta de “lucha o huida” frente a la estimulación simpática. Por otro lado, esta fosforilación puede permitir la reactivación de I_{CaL} durante la meseta de potenciales prolongados, favoreciendo la generación de arritmias (Wu Y y col 2002; Bers DM y Morotti S 2014).

Asimismo, está descrito que la CaMKII desempeña un papel importante en la regulación de la relajación dependiente de la frecuencia cardíaca, modulando la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} . La CaMKII se une y fosforila a la Troponina I (o TnI, con función inhibitoria en la unión de filamentos de actina con los de miosina) en sitios de fosforilación diferentes al de PKA y PKC, que se requiere para mantener la función diastólica (Guilbert A y col. 2015). También ha sido demostrado que CaMKII regula las propiedades de los miofilamentos por fosforilación de la proteína C de unión a miosina (MyBP-C) y de la proteína sarcomérica titina (Hamdani N y col. 2013; Tong CW y col. 2004; Hidalgo CG y col. 2013).

Además de los ya mencionados canales de Ca^{2+} , CaMKII puede fosforilar otros canales tales como los canales de Na^+ (Wagner S y col. 2006), de K^+ (Wagner S y col. 2009) y el intercambiador Na^+-H^+ o NHE-1 (Vila Petroff MG y col. 2010), por lo que la actividad de esta quinasa se encuentra involucrada en la regulación de múltiples procesos fisiológicos y en diversos mecanismos fisiopatológicos. El impacto integrado

de estas acciones de CaMKII sobre las propiedades del PA (tales como configuración, duración, etc.) resulta complejo. Por ejemplo, la activación de CaMKII aumenta la I_{CaL} y la corriente tardía de Na^+ , acciones que tienden a prolongar la duración del PA; pero además aumenta ciertas corrientes de K^+ que tienden a acortar la duración del mismo.

Por otra parte, hasta el momento no se demostraron efectos directos de CaMKII sobre la actividad del NCX. No obstante, en corazones insuficientes se describió un cambio en la expresión del NCX que podría estar mediado por la activación de CaMKII δ_B . Este estudio en cardiomiocitos adultos cultivados, reporta que la transfección con CaMKII en su forma activa incrementa la expresión del NCX, a través de la señalización dependiente de HDAC/MEF-2 (Lu YM y col. 2011).

En resumen y como se mencionó previamente, la CaMKII puede fosforilar varias proteínas que regulan el manejo del Ca^{2+}_i , como los LTCC, el RyR2, y en particular a la PLN, que a través de la activación de la SERCA2a del RS, contribuye al incremento del contenido de Ca^{2+} del RS y en consecuencia al aumento del transitorio de Ca^{2+}_i y la contractilidad miocárdica, evidenciado en un EIP. Además, el aumento en la retoma de Ca^{2+}_i por la mayor actividad de la SERCA2a deriva en un incremento en la velocidad de la relajación que se traduce en un ELP.

1.4.3. Papel de CaMKII en situaciones patológicas

Numerosos trabajos han destacado la relevancia de CaMKII en diversas situaciones patológicas (Grueter CE y col. 2007), apareciendo esta quinasa como una importante señal de enfermedad. Está ampliamente descrito que la actividad de CaMKII está aumentada en condiciones patológicas pudiendo contribuir, a través de una alteración en el AEC, al desarrollo de disfunción contráctil, HC patológica, arritmias y muerte celular (Clusin WT 2003; Bers DM y col. 2006; Wilkins BJ y Molkentin JD 2004; Orrenius S y col. 2015), en diferentes situaciones tales como la insuficiencia cardíaca (IC) y la isquemia/reperfusión (I/R) (Maier LS y col. 2012). El papel de CaMKII sobre la HC se abordará con mayor detalle en la sección 1.4.4.

La CaMKII ha sido implicada en la cardiomiopatía estructural inducida en respuesta al estrés patológico (Anderson ME y col. 2011). Hay evidencias que indican que la estimulación β -AR crónica activa a la CaMKII, aunque las vías de señalización a través de las cuales ocurre esto son controvertidas (Grimm M y col. 2010; Grimm M y col. 2011). Los mecanismos propuestos incluyen la activación de CaMKII a través de los efectos del adenocín monofosfato cíclico (AMPC) y la PKA en los canales de Ca^{2+} (Xu L y col. 2010), de la activación de Epac y PKC (Pereira L y col. 2007; Pereira L y col. 2012; Oestreich EA y col. 2009), la participación de β -arrestina (Mangmool S y col. 2010), o por un mecanismo que involucra una acción directa del NO sobre la quinasa (Curran J y col. 2014). Ambas vías, la estimulación β -AR y la activación de CaMKII, han sido implicadas de manera independiente en el desarrollo de IC (Anderson ME y col. 2011; Grimm M y col. 2010; Ling H y col. 2009; Zhang R y col. 2005; Bristow MR 2011). Si bien

CaMKII aún no ha sido utilizada como un blanco terapéutico, tanto la expresión como la actividad se encuentran aumentadas en modelos experimentales y clínicos de IC (Hoch B y col. 1999; Colomer JM y col. 2003; Zhang T y col. 2003; Ai X y col. 2005). Este aumento ha sido propuesto como causal del remodelamiento adverso del corazón insuficiente y de la progresión hacia la IC (Zhang R y col. 2005). Considerando que el modelo canónico de activación de CaMKII involucra aumentos del Ca^{2+}_i , estos resultados parecen paradójicos teniendo en cuenta que en la IC el transitorio de Ca^{2+} está disminuido con respecto al de corazones no insuficientes (Sossalla S y col. 2010). Sin embargo, y como se mencionó previamente, resultados de nuestro y otros laboratorios han demostrado que la CaMKII puede mantenerse activada por mecanismos independientes del aumento de Ca^{2+} como puede ser un aumento en los radicales libres (ROS) (Palomeque J y col. 2009; Erickson JR y col. 2008). Dado que en el corazón insuficiente los niveles de ROS están aumentados (Li JM y col. 2002), la regulación de CaMKII por ROS, podría explicar en parte porqué la actividad de CaMKII se encuentra aumentada en la IC a pesar de los bajos niveles de Ca^{2+}_i . Ratones transgénicos que sobreexpresan CaMKII δ c desarrollaron miocardiopatía dilatada y una mayor susceptibilidad a la muerte súbita (Zhang T y col. 2003). En tanto, ratones AC3-I que expresan un péptido inhibidor de CaMKII a nivel del miocardio exhibieron un efecto cardioprotector significativo al infarto del miocardio (IM) y a la estimulación β -AR sostenida (Zhang R y col. 2005). Por lo tanto, la activación crónica de CaMKII y sus blancos representan una de las principales señales para la remodelación patológica.

Estudios de nuestro laboratorio han demostrado un rol dual de la CaMKII en I/R, siendo protectora en isquemias cortas, y deletérea en las isquemias largas (Vila Petroff MG y col. 2007). El papel protector de CaMKII radica en la mejora del ciclado de Ca^{2+}_i previniendo la sobrecarga de Ca^{2+} y la injuria producida por reperfusión, mientras que su rol deletéreo se debe a que promueve la apoptosis y necrosis. Sin embargo, el mecanismo subcelular detrás de esta participación dual permanece sin dilucidar.

La activación crónica de CaMKII también puede impactar en el PA del cardiomiocito y producir arritmias de distinta etiología (Clusin WT 2003). La CaMKII puede permitir la reactivación de I_{CaL} durante la meseta de potenciales de acción prolongados, favoreciendo el desarrollo de despolarizaciones tempranas o EADs (en inglés, *Early After Depolarizations*) (Wu Y y col. 2002; Bers DM y Morotti S. 2014). El aumento de la fosforilación de los receptores de RyR2 mediado por CaMKII incrementa la liberación de Ca^{2+} del RS durante la diástole (también conocidas como “chispas” de Ca^{2+}), que puede inducir la salida de Ca^{2+} desde los canales vecinos, generando una onda de Ca^{2+} . Este Ca^{2+} se extruye por el intercambiador NCX, aumentando la entrada de Na^+ y originando una despolarización tardía de la membrana celular (DADs, en inglés *Delayed After Depolarizations*), de modo que si alcanzara el umbral, provoca un latido prematuro (Couchonnal LF y Anderson ME 2008; Maier LS y col. 2012; Pogwizd SM y col. 2001). El aumento de la liberación de Ca^{2+} en diástole puede ser responsable

no sólo de arritmias sino, al menos en parte, de la disfunción contráctil (como ocurre en la IC) y de la apoptosis y/o necrosis, ya que el Ca^{2+} perdido del RS podría sobrecargar a la mitocondria gatillando así la cascada apoptótica (Salas MA y col. 2010; Di Carlo M y col. 2014; Sepulveda M y col. 2013).

La CaMKII ha surgido como una enzima inductora de muerte celular por apoptosis y necrosis (Yang Y y col. 2006; Zhu WZ y col. 2007; Said M y col. 2011; Sang CM y col. 2009; Vila Petroff MG y col. 2007; Sapia L y col. 2010). En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha descrito que la CaMKII media los efectos tóxicos de los digitálicos al promover la aparición de apoptosis y la generación de arritmias (Sapia L y col. 2010; Gonano LA y col. 2011). En este estudio se observó que la administración del digitálico, ouabaina, no solo activa a la CaMKII sino también a una cascada protectora mediada por la vía PI3K/AKT que, sin embargo, es insuficiente para prevenir completamente la apoptosis inducida por el agente inotrópico (Gonano LA y col. 2011). Por otro lado, Zhu y col. indican que la activación de CaMKII, independiente de PKA, es reponsable de la muerte celular programada promovida por estimulación β -AR durante el tratamiento *in vitro* con isoproterenol (Zhu WZ y col. 2003; Zhu WZ y col. 2007). Por su parte, un estudio en miocitos ventriculares cultivados demuestra que la inhibición genética específica de CaMKII en el miocardio, protege contra la apoptosis inducida por estimulación β -AR e indican el papel pro-apoptótico *in vivo* de CaMKII en el IM. Este trabajo sugiere que la regulación del contenido de Ca^{2+} del RS mediada por la PLN, contribuye a reducir la muerte celular por apoptosis a través la inhibición de CaMKII en ratones AC3-I (Yang Y y col. 2006). Estudios aportados por nuestro grupo de investigación describen la implicancia de la activación de CaMKII y la producción de ROS en la apoptosis inducida por taquicardia. En este trabajo se propone que la actividad de la CaMKII en cardiomiocitos de rata aumenta a mayores frecuencias de marcapaseo, estimulando la apoptosis mediada por un incremento de la liberación diastólica de Ca^{2+} y la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial (Sepulveda M y col. 2013). En tanto, un trabajo reciente indica que la oxidación y consecuente activación de CaMKII media la disfunción contráctil asociada con sepsis (Sepulveda M y col. 2017).

Además de los efectos mencionados hasta aquí, la CaMKII también ha sido implicada en el remodelado cardíaco en respuesta a la hipertrofia. A continuación se detalla el rol de esta quinasa en el desarrollo de HC.

1.4.4. Impacto de CaMKII sobre la hipertrofia cardíaca

Existen numerosos trabajos en diversos modelos experimentales y clínicos, que sugieren que CaMKII juega un papel fisiopatológico fundamental en la HC patológica.

Estudios *in vitro* en los que se utilizaron inhibidores farmacológicos selectivos para esta quinasa fueron los primeros en sugerir que CaMKII estaba involucrada en la HC inducida por agonistas hipertróficos. Un primer trabajo realizado en cardiomiocitos ventriculares de rata demuestra que la activación del receptor α -adrenérgico con el

agonista específico Fenilefrina (Phe) indujo, por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} y CaM, la expresión de un programa de genes fetales que incluye al factor natriurético auricular (ANF), un reconocido marcador hipertrófico (Sei CA y col. 1991). Un estudio posterior realizado en cultivo de miocitos de neonatos de rata señaló que la CaMKII estaba asociada con esta modulación, evidenciado por la aplicación farmacológica de KN-93, un inhibidor específico de esta quinasa (Ramirez MT y col. 1997). Otros autores sugieren que la activación de CaMKII en cardiomiocitos neonatales de rata regula la expresión del péptido natriurético cerebral (BNP), otro gen marcador de HC, en respuesta a cambios en el Ca^{2+} , mediados por la activación por la interleuquina 1- β (IL-1 β) (He Q y La Pointe MC 2000). Se ha demostrado que la endotelina 1 (ET-1) aumenta la actividad de CaMKII en cultivo de cardiomiocitos murinos, y el pretratamiento con un inhibidor selectivo (KN-62), suprime el desarrollo de HC mediada por la activación del promotor de la cadena pesada de β -miosina (β -MHC) inducida por ET-1 (Zhu W y col. 2000). Además, en cardiomiocitos ventriculares de rata adulta la respuesta hipertrófica al factor inhibidor de la leucemia (LIF), a través del aumento en la ICa_L , se canceló con el agregado de KN-62, sugiriendo una vez más, la participación de CaMKII en el desarrollo de HC patológica (Kato T y col. 2000).

Por otro lado, la expresión y la actividad de CaMKII δ cardíaca están alteradas en diversos modelos animales de HC. Estudios que examinaron el miocardio de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) mostraron una mayor expresión y actividad de CaMKII δ (Hagemann D y col. 2001; Bokník P y col. 2001). Estos cambios podían revertirse mediante la inhibición de la enzima convertidora de Angiotensina, conduciendo a la regresión completa de la HC desarrollada (Hempel P y col. 2002). Además, estos autores mostraron alteraciones en el patrón de CaMKII δ , sugiriendo la expresión diferencial en las distintas fracciones subcelulares inducida en respuesta a la HC (Hagemann D y col. 2001). En tanto, corazones hipertróficos de conejo por la ligadura de la arteria coronaria, mostraron una mayor actividad y expresión de CaMKII en fracciones aisladas del RS (Currie S y Smith GL 1999). Consistente con estos antecedentes, un estudio *in vivo* señala que la inhibición genética de CaMKII protege contra la HC inducida por Isoproterenol (Zhang R y col. 2005). Existen estudios que describen que la hipertrofia desarrollada por contricción aórtica transversal (TAC) en corazones de ratón o por incrementos agudos en la presión de perfusión en corazones de rata, cursa con una mayor expresión y actividad de CaMKII (Colomer JM y col. 2003; Saito T y col. 2003). Un trabajo más reciente señala que la activación de CaMKII por sobrecarga de presión del VI, contribuye al desarrollo de HC patológica mediado por la activación de los receptores acoplados a proteínas G o GPCR (en inglés, *G Protein-Coupled Receptors*) (Mishra S y col. 2010).

Varios modelos experimentales de ratones transgénicos confirmaron el papel causal de CaMKII en el desarrollo de HC. Los primeros trabajos mostraban que cardiomiocitos aislados de ratones que sobreexpresan a CaM desarrollan HC severa

(Gruver CL y col. 1993). Además, este fenotipo se evidenció en un modelo *in vivo* acompañado de un aumento en la actividad autónoma de CaMKII (Colomer JM y Means AR 2000). También se informó que ratones que tienen sobreexpresada la CaMKII en el corazón, desarrollan una HC grave asociada con cambios específicos en la expresión génica de esta quinasa (Passier R y col. 2000). Es conocido que, en respuesta a estímulos hipertróficos, tanto CaMKII δ_B como CaMKII δ_C se activan. En este sentido, se señala que el papel de CaMKII en la transducción de señales de Ca²⁺ y la regulación de la función cardíaca está determinado por su localización subcelular. La sobreexpresión específica y transitoria de las isoformas δ_C (citoplasmática) y δ_B (nuclear) en cardiomiocitos de ratones transgénicos proporcionó más evidencia de la participación de CaMKII en la HC, demostrado por un aumento en el tamaño celular (Ramirez MT y col. 1997; Zhang T y col. 2003). Por un lado, la isoforma δ_B contribuye al crecimiento hipertrófico modulando las respuestas transcripcionales y la expresión génica, mientras que la isoforma δ_C participa en el manejo del Ca²⁺ y en la apoptosis, favoreciendo el desarrollo de IC.

Está ampliamente reconocido que CaMKII regula factores de transcripción que controlan la expresión de genes involucrados en la HC. La CaMKII activa al MEF-2 (factor potenciador 2 específico de miocito) al disociarlo de una histona desacetilasa (HDAC) de clase II, que actúa como represor transcripcional (Wu X y col. 2006; Zhang T y col. 2007; Backs J y col. 2006; Backs J y col. 2008). De manera específica, la unión y señalización de CaMKII a través de la fosforilación de HDAC4, causa su exportación nuclear y acumulación citosólica, lo que resulta en el desarrollo de HC (Backs J y col. 2006). Además, un estudio reciente muestra que la inhibición farmacológica y la delección génica de CaMKII bloquean la HC, acompañada por una disminución en la fosforilación de HDAC4 (Zhang M y col. 2015).

En la siguiente imagen se representa un posible mecanismo de la vía de señalización intracelular que contribuiría al desarrollo de HC patológica mediada por la activación de CaMKII cardíaca. Como se observa en la figura 8, la activación del receptor GPRP por agonistas hipertrofiantes como Phe o ET-1, inducen la formación de inositol trifosfato (IP₃) que resulta en un aumento del Ca²⁺ y la activación de CaMKII. La CaMKII δ_B fosforila a la HDAC4 en el núcleo y permite su exportación al citoplasma. En consecuencia, MEF-2 y otros factores de transcripción se liberan de la represión de HDAC4 y activan la cascada que conduce al desarrollo de HC patológica. Además, la activación de CaMKII δ_C fosforila a HDAC4 en el citosol y evita que regrese al núcleo. Por lo tanto, HDAC también podría desreprimir MEF-2 e inducir a la transactivación de genes hipertróficos. Por otra parte, la activación crónica de CaMKII δ_C puede fosforilar a las proteínas involucradas en el ciclo del Ca²⁺ y contribuir a la alteración del manejo de Ca²⁺.

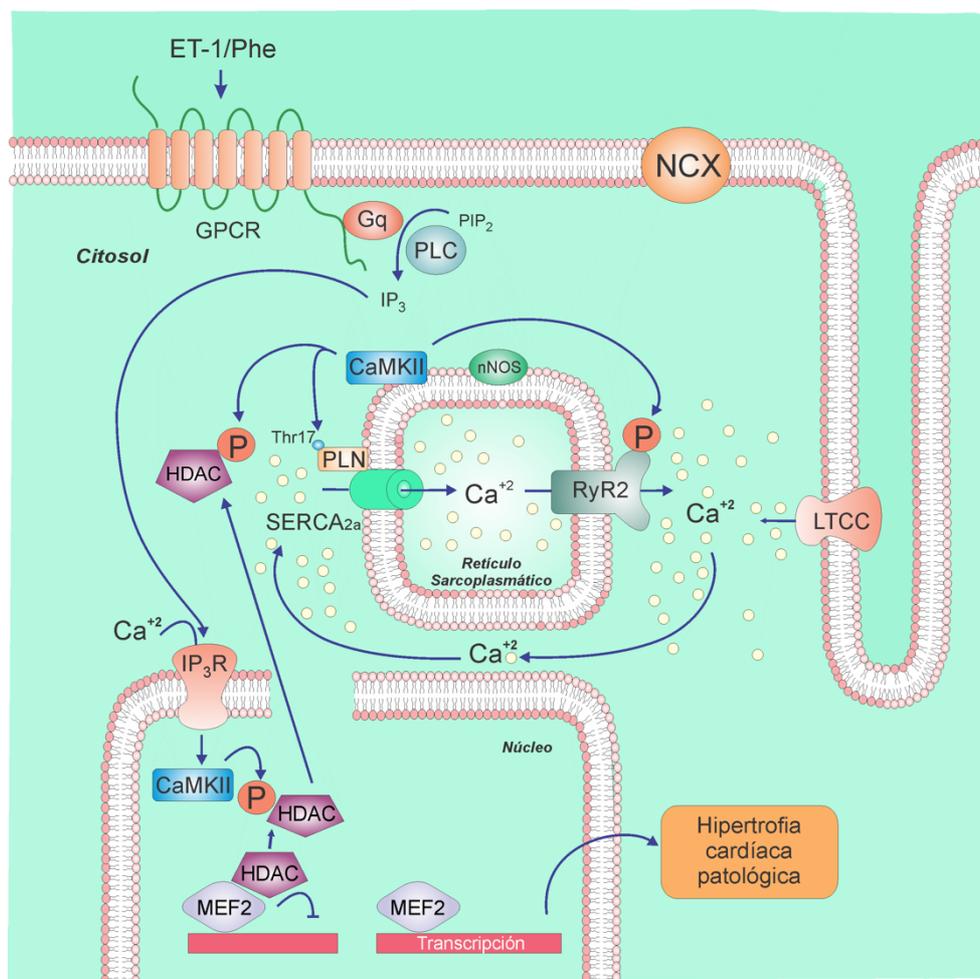


Figura 8. Diagrama de un mecanismo propuesto de activación de CaMKII δ en HC patológica. ET-1, endotelina 1; Phe, Fenilefrina; GPCR, Receptor acoplado a proteína G; Gq, subunidad de la proteína G; IP₃, Inositol Trifosfato; PIP₂, Fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato; PLC, Fosfolipasa C; PLN, Fosfolamban; SERCA2a, bomba de Ca²⁺ ATPasa del RS; CaMKII, Proteína quinasa II dependiente Ca²⁺-CaM; RyR2, Receptores de rianodina tipo 2; LTCC, canales de Ca²⁺ tipo L; NCX, Intercambiador Na⁺/Ca²⁺; IP₃, Inositol (1,4,5)-Trifosfato; HDAC, Histona desacetilasa; IP₃R, Receptor de IP₃; MEF2, factor 2 potenciador de miocitos. Modificada de Mishra S y col. 2010.

Actualmente, no hay evidencias que indiquen el posible rol de CaMKII en la HC fisiológica. Sin embargo, existen algunos trabajos que proponen que el ejercicio físico aeróbico lleva a un aumento en la actividad de CaMKII (Kemi OJ y col. 2007; Kemi OJ y col. 2008; Kaurstad G y col. 2012). Uno de los objetivos de esta tesis será examinar si CaMKII está involucrada en el desarrollo de HC fisiológica.

1.4.5. Papel de CaMKII sobre la adaptación contráctil inducida por ejercicio

La adaptación cardíaca al entrenamiento aeróbico incluye el desarrollo de hipertrofia y la mejora en la contractilidad, como los eventos más importantes. Esta respuesta está mediada por la producción y liberación de varios factores de crecimiento y humorales, entre los cuales el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1) parece ser el más relevante. El entrenamiento físico sostenido

aumenta los niveles cardíacos de IGF-1 tanto en modelos experimentales como en atletas en comparación con los controles sedentarios (Scheinowitz M y col. 2003; Neri Seneri GG y col. 2001). Además, se ha demostrado que el IGF-1 se produce en el tejido cardiovascular, donde probablemente ejerce efectos autócrino/parácrinos. De hecho, la unión de IGF-1 a su receptor específico (IGF-1R) estimula, al menos dos vías de señalización canónicas en los cardiomiocitos: la vía de ERK1/2 y la de PI3K/AKT (Troncoso R y col. 2014), siendo esta última la particularmente implicada en la cascada responsable de la HC.

Con respecto a la adaptación contráctil, evidenciada por un EIP en respuesta al ejercicio, el mecanismo subyacente está en discusión y aún no ha sido aclarado. Es importante destacar que hay datos heterogéneos con respecto a las consecuencias inotrópicas del IGF-1 en diferentes cardiomiopatías (Kinugawa S y col. 1999; Ren J y col. 1998; Ren J y col. 1999). No obstante, la mayoría de los estudios proponen que este factor de crecimiento lleva a un incremento en la contractilidad cardíaca vinculado a la activación de la vía AKT (Vetter U y col. 1988; Freestone NS y col. 1996; Kim SJ y col. 2008; Ellison GM y col. 2012). Entre las cascadas de señalización más relevantes en la mejora de la función contráctil y en el manejo del Ca^{2+} ; asociadas al ejercicio, se postula a la vía de la CaMKII como la principal. En este sentido, Kemi y col. describieron que el ejercicio sostenido aumenta la actividad de la SERCA2a, mejorando significativamente el ciclado del Ca^{2+} en el miocardio (Kemi OJ y col. 2007; Kemi OJ y col. 2008). Estos dos trabajos proponen que la activación de la CaMKII participaría en la adaptación contráctil inducida por el entrenamiento aeróbico evidenciada en una respuesta inotrópica y lusitrópica positiva. Por su parte, Kaurstad y col. reforzó este estudio demostrando que la inhibición farmacológica de CaMKII en corazones de ratones, mediante inyecciones periódicas de KN-93, condujo a la disfunción contráctil y a una disminución en el transitorio de Ca^{2+} , a pesar de someter estos animales a una rutina de entrenamiento físico, sugiriendo que el aumento de la actividad de CaMKII sería necesaria para modular la contractilidad durante el ejercicio (Kaurstad G y col. 2012). Consistente con este trabajo, el grupo de Cheng y col. describe una reducción en la contractilidad cardíaca *in vivo* en ratones CaMKII-KO, en respuesta a la estimulación β -AR inducida con Isoproterenol (Cheng J y col. 2012). Resultados similares se obtuvieron en modelos de ratones y perros con IC sometidos a una rutina de ejercicio moderado (Rolim NP y col. 2007; Lu L y col. 2002). En tanto, Kim y col. propusieron que el tratamiento crónico con IGF-1 mejora la función contráctil en la IC congestiva y la miocardiopatía isquémica. En este estudio, cardiomiocitos aislados de rata aumentaron su contracción y relajación cardíaca debido a una mejora en el ciclado de Ca^{2+} del RS, mediado por un aumento en la expresión de SERCA2a dependiente de AKT (Kim SJ y col. 2008). En conjunto, estos antecedentes sugieren fuertemente que CaMKII sería un regulador crítico de la respuesta contráctil adaptativa asociada al ejercicio aeróbico regular. Confirmar la participación de CaMKII

en la adaptación contráctil asociada al entrenamiento físico y estudiar los mecanismos subcelulares involucrados serán otros de los objetivos del presente trabajo de tesis.

2. El óxido nítrico

2.1. Características estructurales y funcionales

El óxido nítrico (NO) es una pequeña molécula no polar con un electrón desapareado que lo convierte en un radical libre débil (Rang HP y col. 2005). La complejidad de la función del NO se manifiesta a través de las diversas reacciones químicas en las que participa y de las características del tejido en el que opera. El nivel de NO sintetizado es la clave que determina el resultado biológico de las respuestas celulares a sus diversas concentraciones. En general, niveles más bajos de NO promueven la supervivencia y proliferación celular, mientras que concentraciones más altas favorecen la muerte celular, incluyendo a la apoptosis y/o la senescencia.

Actualmente, está ampliamente descrito que el NO desempeña un papel importante en la regulación de diversos procesos fisiológicos en la mayoría de los tejidos, incluido el corazón (Massion PB y col. 2003; Shah AM y MacCarthy PA 2000; Zhang YH y col. 2014; Zhang YH y Casadei 2012). El NO es un gas soluble, altamente difusible, que se propaga rápidamente de su lugar de síntesis y una molécula simple muy reactiva con otras especies, principalmente con el oxígeno, nitrógeno y hierro, que contienen los grupos hemo y actúan como barredores de NO. El NO cumple funciones de señalización intracelular destacada en macrófagos, neuronas, células endócrinas, fibras de músculo esquelético y otros numerosos tipos de células, como en los cardiomiocitos.

Si bien el papel del NO en el miocardio permanece menos definido, existe un consenso creciente de que el NO desempeña un rol clave en la función cardíaca, en gran parte modulando el AEC (Hare JM 2003). Ejerce múltiples respuestas a través de acciones directas sobre los cardiomiocitos e indirectas como consecuencia de sus efectos vasculares. Regula diversas proteínas diana a través de diferentes tipos de modificaciones post-traduccionales (fosforilaciones, S-nitrosilaciones y trans-nitrosilaciones). En particular, modula distintos aspectos de la función miocárdica, incluyendo entre otros, la contractilidad (Vila Petroff MG y col. 1999), la relajación (Vila Petroff MG y col. 2000), la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles (Vila Petroff MG y col. 2000), el fenómeno de la escalera (Cotton JM y col. 2001), la actividad del receptor de RyR2 (Vila Petroff MG y col. 2001) y la respuesta de agonistas β -AR (Balligand JL y col. 1993).

2.2. Biosíntesis de óxido nítrico

El NO puede ser producido a través de mecanismos independientes y dependientes de una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS). La producción de NO independiente de las NOS se origina generalmente en situaciones

patológicas e involucra la participación de nitritos circulantes como donantes de NO (Demoncheaux EA y col. 2002). Por otro lado, en tejidos isquémicos o hipóxicos está descrito que la formación de NO es mediada por la enzima xantino óxido-reductasa (Li H y col. 2004).

Las NOS son una familia de enzimas óxido-reductasas que catalizan la síntesis de NO a partir del aminoácido L-arginina. Se componen de un homodímero en el cual cada monómero está formado por un dominio oxigenasa N-terminal y un dominio reductasa C-terminal. El dominio oxigenasa posee sitios de unión para el grupo hemo, L-arginina y tetrahidrobiopterina (BH₄). Por su parte, el dominio reductasa tiene sitios de unión para NADPH, y las flavinas: Flavín Adenosín Dinucleótido (FAD) y Flavín Mononucleótido (FMN). Entre estas dos regiones se encuentra el sitio de unión para CaM. Tras la unión de BH₄ al complejo, los dos monómeros se unen a través del grupo hemo, promoviendo la formación de un dímero estable. El dominio reductasa transfiere electrones desde NADPH a través de las flavinas hacia el grupo hemo. Posteriormente, la L-arginina es hidroxilada a NG-hidroxi-L-arginina seguido de la oxidación de este intermediario, a través de un electrón de NADPH, formando así L-citrulina y NO (Palmer RM y col. 1988; Andrew PJ y Mayer B 1999). El complejo Ca²⁺-CaM es esencial para vincular FMN y el grupo hemo, asegurando una eficiente transferencia de electrones (Masters BS y col. 2003) (figura 9).

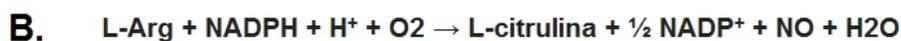
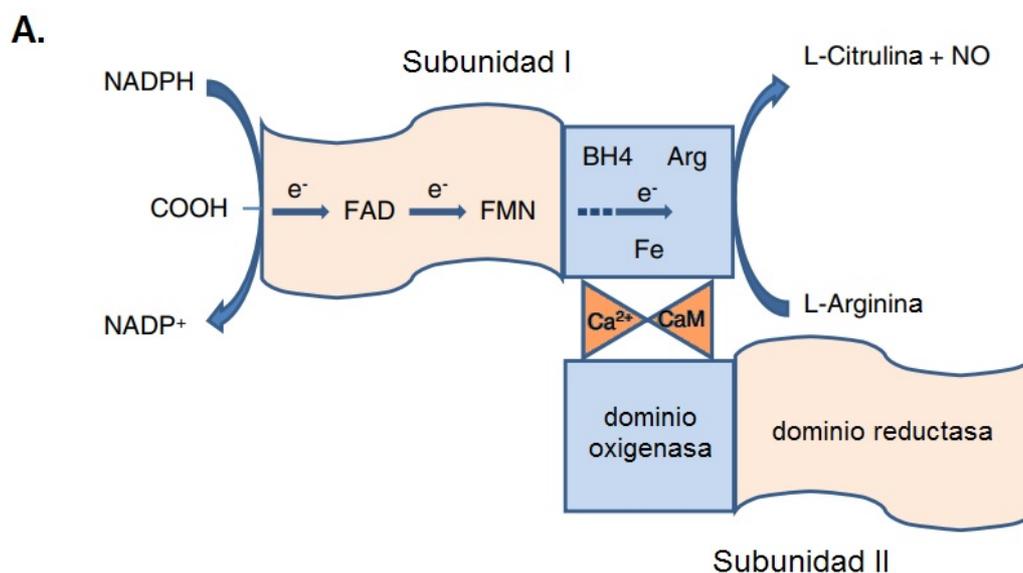


Figura 9. Diagrama esquemático de la estructura dimérica de la NOS, mostrando los sitios de unión a sustratos y cofactores. A. Esta enzima contiene un dominio oxigenasa (-COOH terminal) y un dominio reductasa (-NH₂ terminal). Ambos dominios están separados por calmodulina (CaM). CaM se une al Ca²⁺, dimeriza ambos dominios y activa la enzima. Los electrones (e⁻) son transferidos por FMN y FAD hacia el dominio oxigenasa y así la NOS cataliza la oxidación de L-arginina a L-citrulina+NO. **B.** Reacción de síntesis de NO en la que participan las NOS. Modificado de Zhang YH y Casadei B 2012.

Además, las NOS producen varios radicales libres junto al NO, como por ejemplo superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitritos ($ONOO^-$) y diferentes derivados relacionados con el NO, desencadenando respuestas dependientes de la oxido-reducción.

2.3. El óxido nítrico en el tejido cardíaco

El NO es un regulador muy importante del sistema cardiovascular y su mecanismo de acción es clave tanto para las funciones fisiológicas del miocardio como para prevenir la patogénesis y la progresión del corazón enfermo. Es una molécula esencial para el mantenimiento de la función cardíaca en animales y humanos (Kelly RA y col. 1996; Arnold WP y col. 1997; Furchgott RF y Zawadzki JV 1980; Gruetter CA y col. 1979; Massion PB y col. 2003; Shah AM y MacCarthy PA, 2000). El NO se produce en forma endógena a partir de las diferentes isoformas de las NOS, modula diversas funciones biológicas en el miocardio que incluyen la contractilidad, el metabolismo, el crecimiento, la proliferación y la muerte celular (Massion PB y col. 2003; Shah AM y MacCarthy PA 2000; Xu KY y col. 1999; Zhang YH y Casadei B 2012).

2.3.1. Isoformas de las óxido nítrico sintasas en el corazón

El NO en el corazón puede ser sintetizado a partir de L-arginina por tres diferentes isoformas de NOS: la endotelial (eNOS, codificada por el gen NOS III), la neuronal (nNOS, codificada por el gen NOS I) y la inducible (iNOS, codificada por el gen NOS II). Mientras que las dos primeras se expresan en condiciones fisiológicas, la iNOS se biosintetiza sólo después de la estimulación por varios factores de estrés y citoquinas en procesos inflamatorios (Massion PB y col. 2003). Las enzimas eNOS y nNOS generan una pequeña cantidad de NO, mientras que la actividad de iNOS es aproximadamente mil veces superior (Rang HP y col. 2005).

Las enzimas constitutivas (eNOS y nNOS) son activadas rápidamente por Ca^{2+} en presencia de CaM (Wang Y y Marsden PA 1995) y el control se lleva a cabo, entre otras cosas, a través de los agonistas dependientes del endotelio, como por ejemplo por la acetilcolina, lo que aumenta la concentración de Ca^{2+}_i , incrementando así la formación del complejo Ca^{2+} -CaM. En contraste, la iNOS actúa bajo un mecanismo independiente del incremento de Ca^{2+}_i . Como la iNOS tiene un dominio de unión a Ca^{2+} -CaM de alta afinidad, es activada incluso a bajos niveles de Ca^{2+}_i presentes en condiciones basales, con lo cual no requiere de aumentos de Ca^{2+}_i para su activación (Balligand JL y col 1994; Rang HP y col. 2005; Mungrue IN y col. 2003). La actividad de nNOS está sujeta a regulación a través de su fosforilación, en tanto eNOS, además de este tipo de modificación post-traducciona puede activarse por miristorilación y palmitoilación (Sessa WC y col. 1993).

Como se mencionó previamente, la gran difusibilidad del NO determina que sus efectos no se hallen restringidos al sitio de síntesis. La distancia de difusión se

encuentra limitada localmente por la presencia de mioglobina y a la abundancia de aniones superóxido caracterizados por tener una alta afinidad por el NO, que les permite reaccionar con él, limitando su biodisponibilidad. En tanto, una vez producido el NO tiene una vida media muy corta. Por ello, las distintas isoformas de las NOS se expresan en determinados microdominios celulares y sintetizan NO en la proximidad de la vía de señalización celular, a fin de ejercer sus múltiples y variadas funciones en el miocardio. Resultado de lo expuesto, el efecto neto funcional de NO depende de la combinación de un estímulo específico, actuando sobre una determinada isoforma en una localización subcelular particular en un microambiente definido.

En el corazón, la eNOS está asociada con la caveolina en la caveola, una microestructura especializada formada por pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática (Zhang YH y Casadei B 2012; Balligand JL y col. 2009). La interacción entre la eNOS y la caveolina es reversible, y la liberación de eNOS de esta proteína integral activa la enzima. La nNOS se expresa en condiciones fisiológicas en el RS (Xu KY y col. 1999; Barouch LA y col. 2002) y durante condiciones patológicas se transloca a la membrana sarcolemal (Damy T y col. 2003; Damy T y col. 2004; Xu KY y col. 2003). En cuanto a iNOS, es una proteína citosólica que se encuentra más usualmente en su forma soluble que unida a la membrana. Se expresa específicamente durante respuestas inmunes (Balligand JL y col. 1994), y por ende durante condiciones patológicas que están asociadas a estímulos pro-inflamatorios, como la injuria por I/R (Wildhirt SM y col. 1999), sepsis (Ichinose F y col. 2003), envejecimiento celular (Yang B y col. 2004) e IC (Ziolo MT y col. 2004).

El NO puede regular el manejo de Ca^{2+}_i y la función contráctil del miocardio (Massion PB y col. 2003; Seddon M y col. 2007). Los efectos del NO sobre la contractilidad miocárdica se han estudiado intensamente en una variedad de muestras *in vitro* (cardiomiocitos aislados, trabéculas, corazones enteros) e *in vivo*, tanto en modelos animales como en humanos (Pinsky DJ y col. 1997; Prendergast BD y col. 1997; Vila Petroff MG y col. 2001, Khan SA y col. 2003; Wang H y col. 2008, Ashley EA y col. 2002; Cotton JM y col. 2001). Existen estudios que indican que las isoformas nNOS y eNOS constitutivas median efectos independientes, y en algunos casos opuestos, sobre la estructura y función cardíaca (Xu KY y col. 1999; Barouch LA y col. 2002). En el siguiente apartado se detalla el rol del NO sobre la respuesta contráctil, las vías de señalización involucradas y la participación específica de las isoformas constitutivas en este efecto.

2.3.2. Vías de señalización intracelular involucradas en la respuesta inotrópica al óxido nítrico

El NO puede interactuar con proteínas implicadas en el AEC a través de dos vías generales de señalización: una dependiente (Campbell DL y col. 1996; Wahler GM y Dollinger SJ 1995; Ono K y Trautwein W 1991) y otra independiente de guanosina

monofosfato cíclico o GMPc (Hu H y col. 1997; Campbell DL y col. 1996). Los mecanismos dependientes de GMPc resultan de la unión del NO a la guanilato ciclasa soluble (GCs), promoviendo su activación. En consecuencia, aumenta la producción de GMPc que puede, activar a la proteína quinasa G (PKG) o regular la actividad de fosfodiesterasas (PDE2, PDE3 y PDE5). Las PDEs tipo 2 y 5 son activadas por GMPc mientras que la PDE3 es inhibida por GMPc. Por otro lado, los efectos independientes de GMPc ocurren principalmente vía S-NO, que consiste en la conversión de grupos tiol (-SH) que incluyen a los residuos cisteína (Cys) de las proteínas, para formar S-nitrosotioles.

Además, como se mencionó anteriormente, el NO puede reaccionar con especies reactivas del oxígeno o nitrógeno, interrumpiendo su señalización fisiológica e induciendo potencialmente a la producción de otras moléculas reactivas y tóxicas, afectando a la contractilidad miocárdica (Berry CE y Hare JM 2004).

Un cambio en la respuesta de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} es uno de los mecanismos básicos a través de los cuales se puede regular la contractilidad miocárdica. El otro mecanismo es por una variación del Ca^{2+}_i , también propuesto para explicar los cambios en la contractilidad producidos por NO (Méry PF y col. 1991).

Los efectos del NO sobre la contractilidad en el miocardio así como los mecanismos subcelulares involucrados son evidentemente multifacéticos. Además, está claro que no se pueden atribuir las diversas acciones del NO simplemente a la activación diferencial de vías dependientes o independientes de GMPc. Más probablemente, la respuesta celular al NO dependerá de la concentración del gas alcanzada, de la localización subcelular del mismo, de las estructuras celulares involucradas y del balance final alcanzado entre los procesos dependientes e independientes de GMPc.

A continuación se detallará el rol del NO sobre las distintas proteínas involucradas en el ciclado de Ca^{2+}_i y en el efecto inotrópico desarrollado.

Varios estudios han demostrado que el NO puede conducir a un EIP o EIN de manera dependiente de su concentración (Vila Petroff MG y col. 1999; Kojda G y col. 1996; Mohan P y col. 1996). Además, este efecto dual también depende del grado de estimulación β -AR y, por lo tanto, del estado de activación de la PKA, vía AMPc (Ziolo MT y col. 2001). Es conocido que la PKA puede fosforilar varias proteínas involucradas en el AEC, llevando a un aumento en la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i , y consecuentemente a la mejora en la función contráctil (Hussain M y col. 1997). En estudios previos de nuestro grupo, se describió que bajos niveles de NO pueden aumentar el AMPc a través de la activación de la adenilato ciclasa (AC), independientemente de GMPc e inducir un EIP (Vila Petroff MG y col. 1999). En tanto, altas concentraciones de NO pueden inducir un EIN mediado por una disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} , resultante de la fosforilación de la Tnl

mediada por PKG (Vila Petroff MG y col. 1999). Sustentando a este mecanismo, distintos estudios han demostrado que la PKG fosforila a la TnI en el mismo sitio fosforilado por la PKA, siendo conocido que esta quinasa, a través de la fosforilación de la TnI reduce la afinidad de la TnC por el Ca^{2+} (Blumenthal DK y col. 1978).

Además, está descripto que el NO modula los LTCC (Campbell DL y col. 1996; Wahler GM y Dollinger SG 1995; Zhou YY y col. 1999), aunque los efectos y los mecanismos subyacentes a esta regulación continúan en discusión. Se demostró que puede inhibir o estimular la corriente de los LTCC en miocitos ventriculares aislados, por un mecanismo dependiente de GMPc o a través de la activación directa y reversible por S-NO del canal, respectivamente (Campbell DL y col. 1996, Hu H y col. 1997, Sun J y col. 2006). Un estudio propone que la dismunición de ICa_L está mediada por un descenso de los niveles de AMPc debido a la activación de PDE2 dependiente de GMPc (Kirstein M y col. 1995). Por otro lado, se demostró que el GMPc puede modular la actividad de ICa_L mediante un mecanismo independiente de AMPc intracelular (Wahler GM y Dollinger SG 1995). Contrariamente a lo expuesto, está descrito que bajas concentraciones de GMPc o de un donante de NO estimulan la ICa_L , por la inhibición de la PDE3 dependiente de GMPc. En consecuencia, favorece la producción de AMPc, una mayor liberación de Ca^{2+} desde el RS y un EIP (Vila Petroff y col. 1999; Wink DA y col. 1994).

En lo que respecta a la regulación de la actividad del receptor de RyR2, se observó en diferentes modelos experimentales una respuesta dual, a través de un mecanismo independiente de la producción de GMPc, mediante la S-NO de sus residuos Cys (Stoyanovsky D y col. 1997; Xu L y col. 1998; Zahradníková A y col. 1997). En tanto, varios estudios también proponen la activación de este canal por PKG en un modelo *in vitro* (Xiao B y col. 2006; Takasago T y col. 1991) o a través de la fosforilación por PKA, por un aumento de AMPc mediado por un mecanismo GMPc-dependiente. Además, nuestro grupo de investigación describió en cardiomiocitos aislados de rata adulta que el estrés mecánico, determinado por el estiramiento o por una disminución de la osmolaridad, induce un incremento en la producción intracelular de NO, y consecuentemente, la activación del receptor de RyR2 y el aumento del transitorio de Ca^{2+}_i , promoviendo un EIP (Vila Petroff y col. 2001; Gonano LA y col. 2014).

En cuanto a la PLN y la SERCA2a, está descripto que el NO facilita la relajación de los cardiomiocitos promoviendo la retoma de Ca^{2+}_i por la SERCA2a, incrementando la fosforilación de la PLN en el sitio Ser16 a través de un mecanismo dependiente de GMPc (Raemaekers L y col. 1988; Kranias EG y Hajjar RJ 2012). Además, el NO puede activar la SERCA2a a través de la activación directa por S-NO (Burguer y col. 2009).

Por su parte, se describen efectos activadores sobre el NCX dependientes de GMPc. Se demostró que la densidad de la corriente del NCX aumenta por GMPc en cardiomiocitos aórticos de rata (Furukawa K y col. 1991) y en miocitos neonatales

murinos (Reppel M y col. 2007). Sin embargo, otros autores describen que la actividad de NCX no se ve afectada por NO (Sears y col. 2003).

En la siguiente sección se describirán con mayor profundidad el papel de las diferentes isoformas de la NOS sobre la contractilidad cardíaca y las vías de señalización implicadas, que se resumen en la figura 10 al final del apartado.

2.3.2.1. Respuesta contráctil al óxido nítrico derivado de la eNOS

La eNOS regula principalmente canales de membrana y proteínas contráctiles. Su rol sobre la contractilidad basal es controvertido y esto se podría deber a los distintos modelos utilizados para su estudio. En cardiomiocitos aislados esta isoforma no cumpliría ningún papel en la función basal (Khan SA y col. 2003). En cambio, nuestro grupo ha descrito que eNOS aumenta la contractilidad durante el estiramiento mecánico (Vila Petroff MG y col. 2001). Además, en el corazón entero se observó que participaría en su modulación (Champion HC y col. 2004).

En ratones que tienen sobreexpresada la isoforma eNOS, la contractilidad miocárdica se encontró deprimida (Brunner F y col. 2001). En tanto, se ha observado que el NO derivado de la eNOS disminuye la respuesta contráctil a la estimulación β -AR, evidenciado por una disminución en el transitorio de Ca^{2+}_i y una menor amplitud del acortamiento celular (Gödecke A y col. 2001). En concordancia con este trabajo, Wang y col. demostraron también en ratones que la inhibición aguda de eNOS aumenta la función contráctil frente a un estímulo β -AR (Wang H y col. 2008). Sin embargo, otros autores no observaron diferencias en la respuesta inotrópica entre cardiomiocitos de ratones eNOS-KO y WT (Martin SR y col. 2006).

Por el contrario, la producción de NO por la eNOS podría ejercer un papel cardioprotector frente a la actividad arritmogénica durante la estimulación β -AR. Está descrito que inhibir esta isoforma prolonga la duración del PA e induce una mayor pérdida de Ca^{2+} por el RS durante la diástole, pudiendo contribuir a la generación de arritmias (Wang H y col. 2008). Además, eNOS protegería también del remodelado cardíaco limitando la disfunción contráctil inducida luego de una sobrecarga de presión (Ruetten H y col. 2005).

Un estudio demuestra que el NO derivado de la eNOS promueve la disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} y la disfunción contráctil a través de un mecanismo dependiente de GMPc/PKG (Kaye DM y col. 1999). Por otra parte, la mayoría de los estudios muestra que la activación de eNOS causa una disminución de I_{Ca_L} (Bai CX y col. 2005). En este sentido, ha sido reportado que un análogo de GMPc induce la fosforilación e inhibición de los LTCC, lo que sugiere que este efecto sería mediado por un mecanismo dependiente de PKG (Jiang LH y col. 2000). En concordancia, Ziolo y col. demostraron que la inhibición de la PDE5 disminuye la I_{Ca_L} a través del aumento de la actividad de PKG (Ziolo MT y col. 2003), sugiriendo al GMPc

como una molécula de señalización corriente abajo de eNOS. Además, se ha observado en cardiomiocitos que eNOS podría disminuir la ICa_L a través de un mecanismo independiente de GMPc, por la S-NO directa del LTCC (Sun J y col. 2006).

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha mostrado que el estiramiento axial del músculo cardíaco induce la activación de la vía PI3K/AKT y consecuentemente la fosforilación de eNOS. En este estudio se propone que el NO producido por la eNOS actúa, en forma independiente de GMPc, como segundo mensajero del estrés mecánico aumentando la actividad del RyR2 y la amplitud del transitorio de Ca^{2+} , lo cual contribuye al EIP (Vila Petroff MG y col. 2001).

2.3.2.2. Respuesta contráctil al óxido nítrico derivado de la nNOS

Numerosos estudios en diferentes modelos experimentales indican que la nNOS es la isoforma responsable de la regulación intrínseca de la contractilidad miocárdica, fundamentalmente modulando la homeostasis del Ca^{2+}_i en el AEC (Ashley EA y col. 2002; Sears CE y col. 2003; Burkard y col. 2007; Seddon y col. 2009; Zhang YH y Casadei B 2012; Zhang YH y col. 2014). En este contexto, la localización de la nNOS en el RS sugiere que, dado su proximidad subcelular, el receptor de RyR2 y la SERCA2a serían los blancos principales del NO sintetizado por esta isoforma (figura 10).

Un estudio indica que el NO sintetizado por la nNOS favorece la relajación del cardiomiocito a través del secuestro de Ca^{2+} por la SERCA2a, debido a la fosforilación de PLN en el sitio Ser16 por un mecanismo dependiente de PKA, secundaria a la inhibición de las PP2A y PP1 citosólicas (Zhang YH y col. 2008). Por otro lado, está demostrado que nNOS también modula la actividad de PLN, incrementando su fosforilación en Ser16 a través de la formación de ONOO⁻ (Wang H y col. 2008). Además, el NO producido por esta isoforma puede activar a la SERCA2a a través de S-NO (Burger DE y col. 2009; Cutler MJ y col. 2012, Bencsik P y col. 2008) o indirectamente a través de S-glutathionilación dependiente de ONOO⁻ (Adachi T y col. 2004), aumentando la lusitropía del miocardio. En tanto, en ratones nNOS-KO se ha observado una reducción en la respuesta inotrópica y lusitrópica frente a un estímulo β -AR (Vandsburger MH y col. 2007).

La influencia del NO derivado de la nNOS sobre la actividad del RyR2 es controversial, ya que un estudio en ratones nNOS-KO sugiere que la señalización de nNOS activa al canal contribuyendo al EIP inducido por esta isoforma (Wang H y col. 2010), mientras que otros autores indican que la delección del gen que codifica para la nNOS se asocia a un aumento en la pérdida de Ca^{2+} por el RyR2 (Gonzalez DR y col. 2007), sugiriendo que la deficiencia de nNOS contribuye al aumento de la actividad del canal. También se ha demostrado que el NO producido por la nNOS puede aumentar la actividad del receptor de RyR2 por fosforilación del residuo Ser2814 de manera dependiente de CaMKII (Cutler MJ y col. 2012), proceso que estaría favorecido por la

co-localización de estas tres moléculas (Barouch LA y col. 2002), o a través de S-NO por acción directa de derivados de NO (Stoyanovsky D y col. 1997). Por otra parte, un trabajo reciente de nuestro laboratorio en cardiomiocitos adultos demuestra que el estrés hiposmótico activa a la nNOS y en consecuencia a la producción de NO citosólica, resultando en un EIP mediado por la activación GMPc/PKG-dependiente del RyR2 (Gonano LA y col. 2014).

El NO sintetizado por la nNOS también estimula el ciclado de Ca^{2+} por el RS, mediado por una mayor retoma por la SERCA, facilitando la LCIC y potenciando el fenómeno de la escalera (Danson EJ y col. 2005; Khan SA y col. 2003). Además, en estudios realizados en cardiomiocitos ventriculares de ratones nNOS-KO o a través de la inhibición farmacológica específica, se observó que la nNOS regula los niveles de Ca^{2+}_i ; ya que inhibe la entrada de Ca^{2+} por los LTCC, reduciendo la función contráctil y el transitorio de Ca^{2+} , lo que sugiere que la nNOS juega un papel importante en la contractilidad a través de la modulación de los flujos de Ca^{2+}_i (Sears CE y col. 2003). Cuando los niveles de Ca^{2+}_i aumentan, se estimularía la síntesis de NO lo que atenuaría la I_{Ca_L} . En tanto, el efecto de nNOS sobre los LTCC también puede estar mediado por S-NO como por fosforilación dependiente de GMPc/PKG (Sun J y col. 2006; Campbell DL y col. 1996; Gallo MP y col. 2001; Sumii K y Sperelakis N 1995; Vielma AZ y col. 2016).

Por otra parte, ha sido propuesto que la nNOS induce un ELP mediado por la desensibilización de los miofilamentos al Ca^{2+} en miocitos ventriculares de ratas (Jin CZ y col. 2013).

Estos antecedentes sugieren que, en términos generales, el NO derivado de la nNOS regularía la contractilidad cardíaca a través de la producción de GMPc y de la activación de proteínas quinasas dependientes de GMPc (PKG), de los niveles de AMPc, de las fosfodiesterasas dependientes de AMPc (PKA), y mediante la S-NO de proteínas específicas. En el siguiente esquema se representan los principales blancos y cascadas de señalización gatilladas por nNOS y eNOS en la respuesta contráctil (figura 10).

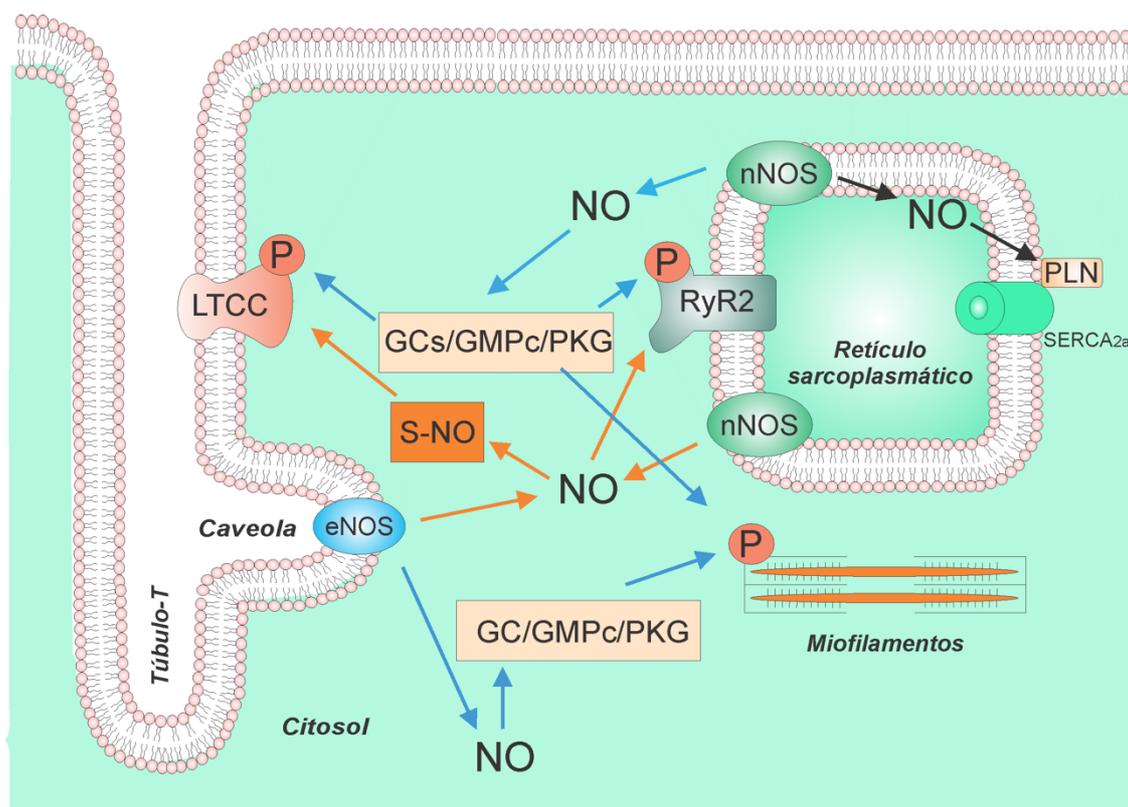


Figura 10. Esquema de la localización y la señalización fisiopatológica de las diferentes isoformas constitutivas de la NOS en el miocardio. Vías de señalización propuestas dependientes (líneas punteadas) e independientes (líneas sólidas) de GMPc. Modificada de Ziolo MT 2008.

2.3.3. Impacto del óxido nítrico sobre la hipertrofia cardíaca

Estudios previos han identificado la participación del NO en la regulación del crecimiento celular y el remodelado cardíaco (Saraiva RM y col. 2005; Pechanova O y Simko F 2010). Los bajos niveles de NO en corazones con falla del miocardio sugieren que el aumento en la expresión génica de la NOS, tal como ocurre en el corazón de atleta, sería beneficioso para prevenir la HC patológica e inducir al desarrollo del remodelado cardíaco fisiológico. El rol cardioprotector del NO está asociado con la reducción de la fibrosis y la apoptosis, y con la inhibición de las vías de señalización mediadas por el estrés oxidativo.

Los primeros trabajos publicados indicaban a la eNOS como la principal isoforma involucrada en los efectos cardioprotectores frente a la sobrecarga de presión, la I/R y el remodelado estructural inducido por el IM (Massion PB y Balligand JL 2007). De hecho, Smith y col. demostraron que la transferencia génica de eNOS en el corazón atenuaba tanto la HC como el IM (Smith RS y col. 2005). Este trabajo señalaba que el aumento de la expresión de eNOS por activación de NF- κ B proporcionaba efectos beneficiosos que llevaban a revertir el remodelado cardiovascular patológico. Por su parte, varios estudios han atribuido el desarrollo de HC, fibrosis y necrosis, así como la hipertrofia de la pared vascular y la proliferación celular en ratas hipertensas,

a la deficiencia de NO (Pechánová O y col. 1997; Bernátová I y col. 1999; Kitamoto S y col. 2000).

Estudios recientes señalan que la isoforma nNOS es también considerada cardioprotectora, si bien los mecanismos no han sido completamente dilucidados. Se ha observado en ratones nNOS-KO, que luego del IM se desarrolla una mayor HC y dilatación de VI, como así también un aumento en la mortalidad celular (Saraiva RM y col. 2005; Dawson D y col. 2005). Además, la sobreexpresión de nNOS en cardiomiocitos ventriculares aislados de ratones transgénicos adultos mejoró la función cardíaca y redujo la HC posterior al IM (Janssens S y col. 2004).

El NO y las ROS se vinculan con el desarrollo de HC debido a sus efectos sobre la vasculatura, pero también como moléculas de señalización en el corazón. Los estudios señalan que ratones que tienen delecionada tanto eNOS como nNOS (nNOS-KO y eNOS-KO) desarrollan HC, fibrosis intersticial y un aumento de la mortalidad de los cardiomiocitos (Barouch LA y col. 2002; Barouch LA y col. 2003). Si bien cada isoforma conduce a la activación de diferentes cascadas de señalización (Cappola TP y col. 2003), solo los ratones eNOS-KO son hipertensos. Sin embargo, la vía NO/GMPc/PKG ha demostrado tener efectos anti-hipertroóficos en el corazón (Takimoto E y col. 2005), debido a la inhibición de la vía calcineurina/NFAT, que estimula el desarrollo de HC. Además, la S-NO también puede contribuir a la regulación de la señalización de HC a través de la activación del NFkB (Marshall HE y Stamler JS 2001) e Ikb (Reynaert NL y col. 2004).

Es posible que el NO derivado de nNOS o eNOS evite el desarrollo de HC ya que ratones nNOS-KO desarrollan HC aún en ausencia de aumento de presión sanguínea (Barouch LA y col. 2002; Barouch LA y col. 2003) y en ratones eNOS-KO, la restauración de la PA normal tampoco previene la HC (Ichinose F y col. 2004). Por su parte, el papel de la iNOS en la HC sigue siendo discutido, se han informado efectos beneficiosos de la deficiencia en su expresión (Zhang P y col. 2007) y por otro lado, que no afecta en su desarrollo (Hataishi R y col. 2006).

Tomados en conjunto, la mayoría de estos antecedentes sugieren que el NO tendría efectos beneficiosos previniendo el desarrollo de HC patológica, evitando la expresión del programa de genes fetales, preservando la homeostasis del Ca^{2+} en el miocardio y conduciendo al remodelado fisiológico del miocardio.

2.3.4. Rol del óxido nítrico en los efectos cardíacos adaptativos del ejercicio

Existe una fuerte evidencia que sustenta un papel clave del NO en el EIP inducido por el ejercicio sostenido (Roof SR y col. 2013). Por su parte, la vía PI3K/AKT activada por IGF-1 en el caso del ejercicio físico, tiene como uno de sus blancos moleculares a las NOS, que una vez fosforiladas aumentan la producción de NO (Kawasaki K y col. 2003; Haynes MP y col. 2000; Curran J y col. 2014). Estudios previos

indican que los niveles de NO (nitritos y nitrosotioles) están incrementados durante el ejercicio, tanto en roedores como en el plasma humano (Brown DA y col. 2005; Zhang Y y col. 2006; Ellison GM y col. 2012). En este contexto, un estudio describe que el ejercicio aeróbico protege contra el remodelado β -adrenérgico crónico y el desarrollo de HC patológica por activación de la isoforma eNOS, mientras que el tratamiento con L-NAME suprime los efectos cardioprotectores del entrenamiento físico (Husain K 2004; Yang L y col. 2014). Además, el grupo de Ziolo y col. mostró en cardiomiocitos aislados de ratones adultos que el ejercicio aumenta la contractilidad miocárdica de manera dependiente de la nNOS (Roof SR y col. 2013). Esta conclusión fue corroborada con el uso de ratones nNOS-KO que no presentaron una mejora contráctil en respuesta al ejercicio. El mecanismo molecular responsable descrito en la mejora del ciclado de Ca^{2+} propone un aumento en la fosforilación en el sitio Ser16 de PLN probablemente debido a la inhibición de una fosfatasa mediada por nNOS. Ello da lugar a un aumento del contenido Ca^{2+} en el RS permitiendo una mayor liberación Ca^{2+} durante la sístole (Roof SR y col. 2013; Roof SR y col. 2015). Sin embargo, la interacción entre el NO y la fosfatasa es sólo especulativa en la actualidad. En este punto, es oportuno recordar que PLN es también fosforilada por CaMKII, y esta quinasa puede ser activada no sólo por un aumento de Ca^{2+} , sino también por NO (Curran J y col. 2014).

3. El óxido nítrico y su vínculo con la CaMKII

Como se desprende de los antecedentes descritos a lo largo de esta tesis, CaMKII y NO regulan procesos fisiopatológicos similares, sugiriendo una posible interacción funcional entre ambas moléculas de señalización. A pesar de que existen evidencias de que en tejido nervioso el NO podría inhibir a la CaMKII (Song T y col. 2008), trabajos más recientes en tejido cardíaco indican lo contrario (Curran J y col. 2014; Gutiérrez DA y col. 2013; Jian Z y col. 2014; Erickson JR y col. 2014).

En este contexto, estudios realizados en muestras de cerebro han demostrado que la nNOS puede ser fosforilada y regulada por CaMKII α (Hayashi Y y col. 1999, Komeima K y col. 2000), y de manera inversa, que esta isoforma de CaMKII podría también estar inhibida por el NO (Song T y col. 2008). El primer trabajo que describe a una posible vinculación del NO con la CaMKII postuló entonces que la quinasa podría fosforilar a la nNOS en su sitio Ser874, promoviendo la activación de la enzima en tejido cerebral de ratas. Por su parte, el grupo de Song y col., fue el primero en señalar la modulación de CaMKII por NO. Este estudio, realizado en células de tumor pituitario, identifica al NO como un potente inhibidor de la CaMKII, al promover su S-NO.

Sin embargo, estudios recientes en músculo cardíaco describen que la estimulación β -AR activa a la CaMKII δ , a través de una vía dependiente de la nNOS, aumentando la pérdida de Ca^{2+} del RS por los receptores de RyR2 (Curran J y col. 2014; Gutiérrez DA y col. 2013; Jian Z y col. 2014). Además de que la actividad de CaMKII δ en el miocardio es aumentada por los donantes de NO (Zhang DM y col. 2014), nuevos

hallazgos demuestran que la CaMKII puede ser nitrosilada en miocitos aislados (Curran J y col. 2014; Gutiérrez DA y col. 2013). De esta forma, la CaMKII δ cardíaca puede ser modificada directamente por un donante de NO mediante la S-NO de sitios específicos (Gutiérrez DA y col. 2013; Erickson JR y col. 2014). Sin embargo, aún son controvertidas las consecuencias de dicha modificación sobre la actividad de la enzima. Erickson y col. describen el rol dual del NO en tejido cardíaco, mostrando efectos opuestos, previo o posterior a la unión al complejo Ca²⁺-CaM, respectivamente. En este trabajo se postula que la interacción de CaMKII δ con el complejo genera un cambio conformacional que deja al sitio Cys290 disponible para la nitrosilación (de su forma basal e inactiva a su estado activo), evitando el impedimento estérico de la quinasa generado por la asociación entre los dominios regulatorio y catalítico (Erickson JR y col. 2011). Existen 3 posibles residuos de Cys (Cys290, Cys273, y Cys116) en CaMKII, con cadenas laterales de tiol que pueden ser nitrosilados (Gutiérrez DA y col. 2013), siendo el sitio Cys290 indispensable para la activación autónoma persistente de la quinasa inducida por NO. Estos autores identifican varios sitios consenso de S-NO en las distintas isoformas de CaMKII y sugieren una potencial “zona caliente” en la activación de esta quinasa mediante modificaciones post-traduccionales (Erickson JR y col. 2015). A su vez, existen evidencias de que la actividad de CaMKII δ es incrementada por NO a través de la vía GMPc/PKG (Zhang DM y col. 2014).

Teniendo en cuenta los antecedentes hasta aquí mencionados, sumado a los estudios recientes que indican que tanto NO como CaMKII δ estarían involucradas en las adaptaciones contráctiles e histológicas asociadas al ejercicio aeróbico (Kemi OJ y col. 2007; Roof SR y col. 2013), resultaba interesante investigar si ambas moléculas forman parte de una misma cascada de señalización que lleva al desarrollo de HC fisiológica y a la mejora de la función contráctil asociadas con el ejercicio regular. Dilucidar este interrogante fue el objetivo central de este trabajo de tesis.

Dado que el mediador más importante de la respuesta adaptativa al ejercicio sostenido es el IGF-1, se examinará el efecto del IGF-1 exógeno sobre la contractilidad, el manejo del Ca²⁺, la producción de NO y la activación de CaMKII, en corazones y cardiomiocitos aislados de ratón. De esta manera, se buscará dilucidar si el tratamiento agudo con IGF-1 en cardiomiocitos aislados promueve un incremento en la producción de NO citosólico que resulte en la activación de CaMKII y en consecuencia, de un aumento de la contractilidad cardíaca. Por otro lado, se utilizará un modelo de ejercicio aeróbico en ratones sometidos a un protocolo de natación para explorar estos mismos eventos, su ruta de señalización intracelular y su vinculación con la HC fisiológica.

A partir de los resultados obtenidos, se intentará definir el rol fisiopatológico de la interacción entre CaMKII y NO, y comprender los mecanismos íntimos involucrados en los procesos de la adaptación contráctil y el desarrollo de HC fisiológica asociados con el ejercicio.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis doctoral fue estudiar el papel del óxido nítrico (NO) y de la Ca^{2+} /Calmodulina Quinasa II cardíaca (CaMKII δ) en la adaptación contráctil y en el desarrollo de la HC fisiológica asociadas con el entrenamiento aeróbico sostenido. Los objetivos principales planteados fueron los siguientes:

1. Evaluar si el NO modula la actividad de la CaMKII miocárdica en respuesta al tratamiento agudo con IGF1 o al ejercicio físico regular.
2. Determinar el impacto de esta regulación sobre el desarrollo de la HC fisiológica y la adaptación contráctil asociada con el ejercicio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para el desarrollo de esta tesis doctoral utilizamos 3 modelos de experimentación con los cuales se propusieron los siguientes objetivos específicos.

En un modelo *in vitro*:

- Estudiar el efecto agudo del IGF-1, principal efector activado por el ejercicio, sobre la contractilidad de cardiomiocitos ventriculares aislados de ratón adulto.
- Examinar el rol de CaMKII en el efecto inotrópico positivo (EIP) inducido por IGF-1 en miocitos aislados de ratones WT tratados con un inhibidor farmacológico específico para CaMKII y en ratones transgénicos que expresan un péptido inhibidor específico de esta quinasa a nivel del miocardio.
- Determinar si el IGF-1 promueve la producción de NO.
- Dilucidar la/s isoformas de las NOS responsables en la síntesis de NO inducidas por el tratamiento agudo con IGF-1.
- Explorar el impacto de la regulación de la vía NO/CaMKII sobre las proteínas involucradas en el manejo de Ca^{2+}_i en respuesta a la administración de IGF-1.

En un modelo *ex vivo*:

- Estudiar si el NO regula la actividad de CaMKII en un modelo agudo de corazones de ratón perfundidos con IGF-1 o con un donante de NO (SNAP).
- Dilucidar los distintos eslabones que componen la vía de señalización por la cual la administración aguda de IGF-1 induce el EIP y una mejora en el manejo de Ca^{2+}_i .

En un modelo *in vivo*:

- Explorar la cascada de señalización intracelular que lleva al desarrollo de HC fisiológica evaluando las proteínas involucradas en el ciclado de Ca^{2+}_i , en corazones de ratón sometidos a una rutina de entrenamiento.
- Determinar el impacto de la regulación de NO/CaMKII sobre la HC fisiológica y la adaptación contráctil inducida por ejercicio aeróbico sostenido en ratones WT y transgénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aspectos generales

Todos los procedimientos seguidos durante esta investigación han sido realizados de acuerdo a las normas generales para el cuidado y uso de animales de laboratorio, estipuladas en la "Guide for the care and use of laboratory animals, NIH publication 2011" y aprobados por el "Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación" (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de La Plata.

Se utilizaron ratones macho C57BL/6 WT (wild-type o silvestres) (18-25 g) como controles. Se usaron ratones macho transgénicos con la expresión constitutiva (bajo el control de un promotor cardíaco) de un péptido inhibidor de CaMKII cardíaca (AC3-I) o de un péptido desordenado o "scrambled", es decir, de igual longitud y cuya secuencia de aminoácidos original ha sido cambiada al azar para generar un péptido que no inhibe a CaMKII (AC3-C), utilizado como control (Zhang R y col. 2005). Los ratones genéticamente modificados se generaron a partir de los C57BL/6. Los animales, estudiados a la edad de 8-10 semanas, se mantuvieron a temperatura constante (23°C) en un ciclo luz/oscuridad estándar (12:12 horas), alimentados *ad libitum* y con libre acceso al agua.

2. Protocolo de ejercicio en ratones

Los ratones fueron asignados aleatoriamente a un grupo Sedentario (Sed) o Nadador (Nad) y se dividieron en seis grupos: (1) WT Sedentario, (2) WT Nadador (3) AC3-C Sedentario, (4) AC3-C Nadador, (5) AC3-I Sedentario y (6) AC3-I Nadador. El protocolo de entrenamiento de natación se modificó a partir de un procedimiento previamente publicado en ratas (Yeves AM y col. 2014), adaptado a este modelo *in vivo* de ratón (Kim J y col. 2008). Brevemente, los ratones adultos en el grupo Nadador (Nad) fueron entrenados, sin carga, 5 días/semana, dos veces al día durante 6 semanas en agua climatizada (30-32°C). La primera semana consistió en un período de adaptación del entrenamiento; comenzando con 20 min/día de natación y aumentando diariamente en 10 min hasta los 90 min/día. Los ratones del grupo Sedentario (Sed) se colocaron en la pileta de natación durante 10 min, dos veces por semana para imitar el estrés asociado con el protocolo experimental (figura 11). Al finalizar la rutina de entrenamiento, los ratones se pesaron y se sacrificaron por dislocación cervical. Los corazones se lavaron con PBS, se drenaron y se pesaron. Las tibias derechas se extirparon cuidadosamente para sus mediciones precisas y se calculó el peso del corazón (PC) sobre la longitud de la tibia (LT).



Figura 11. Imágenes fotográficas de la rutina de entrenamiento de los ratones nadadores. Los animales fueron ejercitados en una pileta de natación climatizada durante un período de 6 semanas, 10 sesiones de 45 minutos por semana. Los ratones sedentarios se colocaron en la pileta 2 veces por semana para imitar el estrés asociado al protocolo experimental.

3. Análisis ecocardiográfico

Los ratones fueron monitoreados por ecocardiografía al inicio y al final de la rutina de entrenamiento, a través de un ecocardiógrafo Vevo 770 acoplado a un transductor de 30 mHz (Visual Sonics). Las imágenes bidimensionales se adquirieron en el grosor del músculo ventricular izquierdo mediante un registro en modo M a velocidad de barrido de 50 mm/seg. Las imágenes congeladas se digitalizaron para realizar las mediciones *off-line* sin conocimiento de la intervención experimental a la que fueron sometidos. Las determinaciones fueron realizadas de acuerdo a los métodos de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Sahn DJ y col. 1978).

De cada registro se tomaron los siguientes parámetros, tal como se muestra detallado en la siguiente figura 12A: diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo (DDVI), diámetro sistólico final del VI (DSVI), espesor diastólico del tabique interventricular (TIVd), espesor sistólico del tabique interventricular (TIVs), espesor de la pared posterior del VI en diástole (PPd) y en sístole (PPs). A partir de estas medidas

se calcularon el porcentaje de la fracción de acortamiento (%FA) y la masa ventricular izquierda (MVI), que relativo al peso del animal indica el índice de la masa del VI (IMVI) (figura 12B).

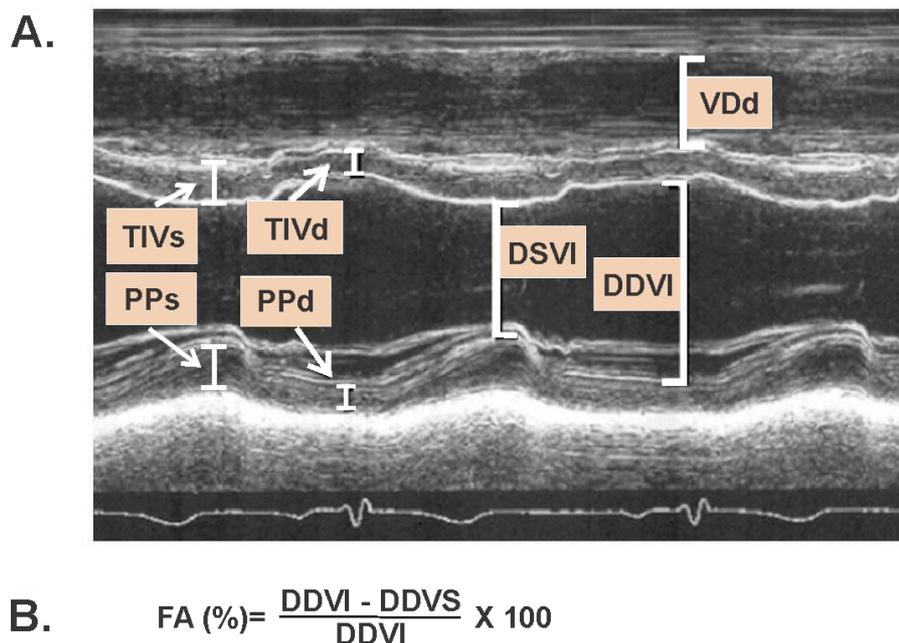


Figura 12. Registro de ecocardiografía del corazón de ratón. Imagen ecocardiográfica modelo con los parámetros medidos indicados (A). Fórmulas utilizadas para calcular FA y MVI a partir de las mediciones (B). TIVs: espesor sistólico del tabique interventricular; TIVd: espesor diastólico del tabique interventricular; PPd: espesor de la pared posterior del VI en diástole; PPs: espesor de la pared posterior del VI en sístole; DSVI: diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo; DDVI: diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo; VDd: diámetro del ventrículo derecho en diástole.

4. Estudios histológicos

El tejido del VI fue fijado en formaldehído al 10% y embebido en parafina. Las secciones coronales del ecuador del VI (4 μm de grosor) se tiñeron con hematoxilina-eosina para la determinación del área de sección transversal de cardiomiocitos o STC (CSA del inglés, *Cross Sectional Área*) o mediante la técnica de picrosirius para la cuantificación de fibrosis (% de colágeno intersticial). Todas las secciones teñidas se observaron en el microscopio (Olympus BX-50, Tokio, Japón) y las imágenes fueron capturadas usando una cámara digital, y procesadas con un programa de morfometría (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MA). La STC se determinó en 50 células cardíacas de cada animal, seleccionadas aleatoriamente. Sólo se consideraron aquellos cardiomiocitos que mostraban un núcleo evidente en la sección transversal. El análisis se realizó sin conocimiento de los grupos de tratamiento y los códigos se revelaron luego del análisis estadístico.

5. Aislamiento de cardiomiocitos de ratón

Los ratones WT y transgénicos se sacrificaron por dislocación cervical, a los 10 min de la inyección intraperitoneal con 1 ml de heparina sódica (200 U/ml) para evitar la formación de coágulos. Los miocitos cardíacos fueron aislados por la digestión enzimática basada en colagenasa, de acuerdo con una técnica en el sistema de perfusión tipo Langendorff (Zhag R y col. 2005, Liao R y col. 2012). El acceso al corazón se logra realizando una toracotomía, mediante una incisión a la altura del esternón, que deja expuesta la totalidad de la cavidad torácica. Finalmente, como se puede observar en la figura 13, el corazón se remueve y se monta en el equipo de perfusión mediante canulación de la aorta.

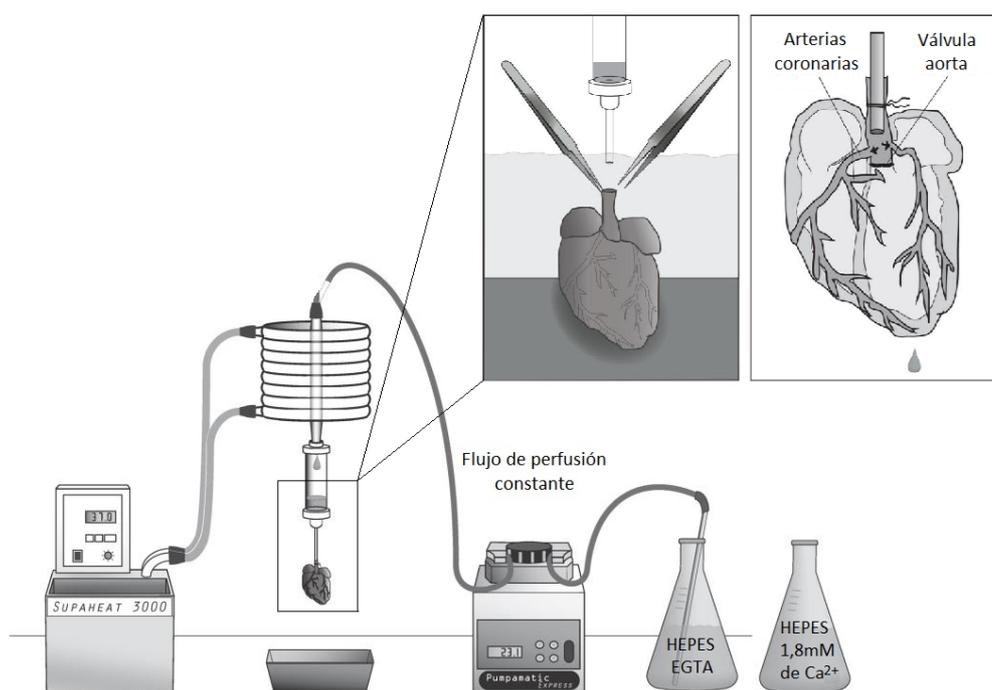


Figura 13. Sistema de perfusión de tipo Langendorff para el aislamiento de cardiomiocitos ventriculares de ratón. Los cardiomiocitos se aíslan usando este tipo de equipo de perfusión retrógrada del corazón con soluciones que contienen enzimas digestivas. El método de aislamiento se realiza a presión constante mediante la utilización de una bomba. La temperatura puede ser regulada por medio de un baño adaptado a una serpentina por la cual circula la solución de perfusión. El corazón se fija a una cánula, con la ayuda de dos pinzas de cirugía, asegurando su sujeción con un hilo atado alrededor de la aorta. Luego de la correcta canulación, la válvula aórtica se cierra cuando se inicia la perfusión y se fuerza el perfundido a través de las arterias coronarias. Modificado de Louch WE y col. 2011.

Inicialmente, el corazón se perfunde durante 4 min a temperatura ambiente con una solución HEPES de la siguiente composición (en mM): 146.2 ClNa, 4.7 ClK, 1.8 Cl₂Ca, 10 HEPES, 0.4 H₂PO₄Na, 1.1 Cl₂Mg, 10 Glucosa (pH ajustado a 7.4 con NaOH). A este buffer se le adiciona 0.1 mM de un quelante de Ca²⁺, EGTA (compuesto capaz de unirse al Ca²⁺ libre) que permite que se debiliten las uniones intercelulares y el corazón deje de latir (Vila Petroff M. Aislamiento de Miocitos. En: Introducción al Análisis Científico del Aparato Cardiovascular en Bioingeniería 2004).

El siguiente paso consiste en recircular durante 10 min, una solución de digestión basada en la solución HEPES y compuesta además por: 0.5mM de Cl_2Ca , 0.5 mg/ml de colagenasa tipo II (300 U/ml), 0.02 mg/ml de proteasa y albúmina bovina 0.5 mg/ml. El proceso de digestión transcurre a 37°C , y en su etapa final se puede observar la menor consistencia del corazón (flacidez propia del progreso del aislamiento). Las soluciones son burbujeadas con O_2 al 100%.

Una vez concluida la digestión, el corazón se desmonta del Langendorff y el tejido ventricular no digerido se disocia mecánicamente con tijeras. De esta forma se obtiene una suspensión de células que atraviesan 4 pasos de decantación y resuspensión en soluciones cada vez más concentradas de Cl_2Ca , hasta lograr una concentración final de 1.8 mM que se utiliza en los posteriores experimentos. Este pasaje escalonado por soluciones progresivamente más concentradas en Ca^{2+} tiene como finalidad evitar la muerte celular por recalcificación rápida. Finalmente, las células cardíacas aisladas (modelo *in vitro*) son conservadas en buffer HEPES a $20\text{-}24^\circ\text{C}$, donde se mantienen en suspensión hasta su utilización dentro de las siguientes 6 horas (Vila Petroff MG y col. 2000). Al comienzo de un experimento, el criterio considerado para utilizar o descartar a un determinado cardiomiocito, está basado en la comprobación de sus características morfológicas (indicadas en la figura 14) y su capacidad para contraerse ante la estimulación eléctrica.

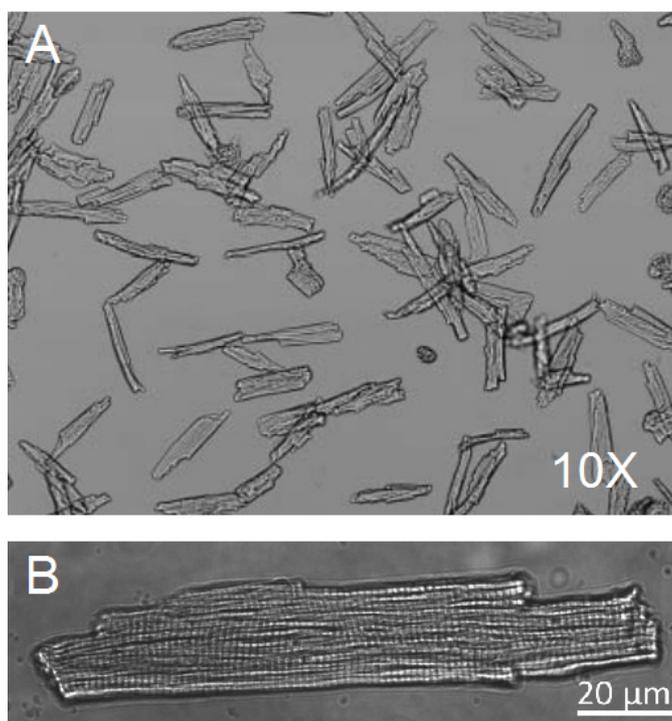


Figura 14. Imagen de miocitos cardíacos de ratón aislados mediante digestión enzimática. Los cardiomiocitos fueron conservados en solución HEPES con 1.8mM de Ca^{2+} para su posterior utilización. Se observa, al microscopio óptico invertido Nikon y un objetivo con un aumento de 10X acoplado a un sistema de adquisición de imágenes Nikon Digital Sight, que el aislamiento tiene un rendimiento superior al 80% de viabilidad celular (A). En la imagen se puede observar un patrón sarcomérico conservado y bordes regulares de la célula cardíaca iluminada con luz transmitida (B).

6. Transitorios de Ca^{2+} y medidas de acortamiento celular

Con el propósito de monitorear en tiempo real las características del ciclado de Ca^{2+}_i , se realizaron experimentos funcionales mediante microscopía de epifluorescencia en cardiomiocitos aislados de ratón. Las células cardíacas fueron incubadas durante 12 min a temperatura ambiente con el indicador sensible a Ca^{2+} , Fura-2, en una concentración de 10 μM (Ren J y col. 1998; Gonano L y col. 2014).

Los ensayos en los que se registran cambios rápidos en la concentración de iones intracelulares requieren tiempos de carga cortos (10-30 min), baja concentración del indicador, temperatura ambiente y alta densidad celular. La combinación de estos factores permite obtener la máxima concentración de moléculas del indicador internalizadas dentro de las células. Luego del período de incubación, las células se centrifugaron a baja velocidad durante 1 min y se resuspendieron en solución HEPES libre de indicador, para descartar a aquellas moléculas de indicador que no ingresaron al compartimento intracelular.

El Fura-2 se utiliza en su forma permeante éster de acetoximetilo (AM), que se comporta como una molécula hidrofóbica capaz de atravesar con facilidad la membrana plasmática. Una vez dentro del citosol, las esterasas intracelulares hidrolizan la unión éster liberando la porción AM y la forma ácida activa del fluoróforo, que queda retenida en el interior celular (sonda molecular). Por esta razón, las células no se utilizaron hasta luego de transcurridos 30 min posteriores a la incubación con el indicador, para permitir la desesterificación intracelular del mismo y trabajar con células que contengan una concentración intracelular estable de Fura-2 (Vila Petroff MG y col. 2004).

Las células ya cargadas se colocaron sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon Diaphot 200) adaptado para la técnica de epifluorescencia tal como lo indica la figura 15. Las mismas se perfundieron con solución HEPES a un flujo constante de 1 ml/min con 1.8 mM de Ca^{2+} y estimuladas eléctricamente por campo con ondas cuadradas de 10 milisegundos (mseg) de duración y una intensidad que supere en un 20% el umbral de activación de los miocitos. Estos estímulos eléctricos son enviados a través de dos electrodos de platino, ubicados a cada lado de la cámara de perfusión a una frecuencia de 0.5 Hertz (Hz).

Para obtener una señal fluorescente sensible al Ca^{2+} citosólico, la muestra se iluminó mediante una lámpara de Xenón, filtrando el haz de luz para excitar a dos longitudes de onda (340 nm y 380 nm) en forma alternada. La fluorescencia emitida por las células fue registrada a >510 nm y amplificada por un fotomultiplicador (R2693, Hamamatsu). La excitación alternada con dos longitudes de onda permite calcular un cociente entre la señal emitida por el indicador cuando es excitado con luz de 340 nm de longitud de onda (en estas condiciones la emisión varía según se encuentre o no interactuando con moléculas de Ca^{2+}) y la señal emitida cuando es excitado con luz de

380 nm de longitud de onda (en esta condición la intensidad de señal emitida es independiente de la interacción entre moléculas de fluoróforo y Ca^{2+}). La obtención de este cociente permite normalizar la señal fluorescente adquirida por la cantidad de moléculas de fluoróforo que se encuentran en condiciones de emitir señal fluorescente a lo largo del experimento, evitando artefactos derivados del apagamiento (“quenching”) del fluoróforo o su salida de la célula. De esta manera, la relación o ratio de la fluorescencia emitida a las dos longitudes de onda (340/380) se considera una medida del Ca^{2+}_i .

Con el propósito de generar contraste óptico entre los bordes celulares y el fondo de la cámara de perfusión, la célula a estudiar es iluminada con luz roja (640-750 nm) a través de un sistema óptico para luz visible. De esta forma se logra la videodetección de bordes celulares, lo que permite registrar la longitud y monitorear el acortamiento de los cardiomiocitos. Los datos adquiridos son almacenados en un software adecuado (ION Optix análisis) para su posterior análisis *off-line* (figura 15).

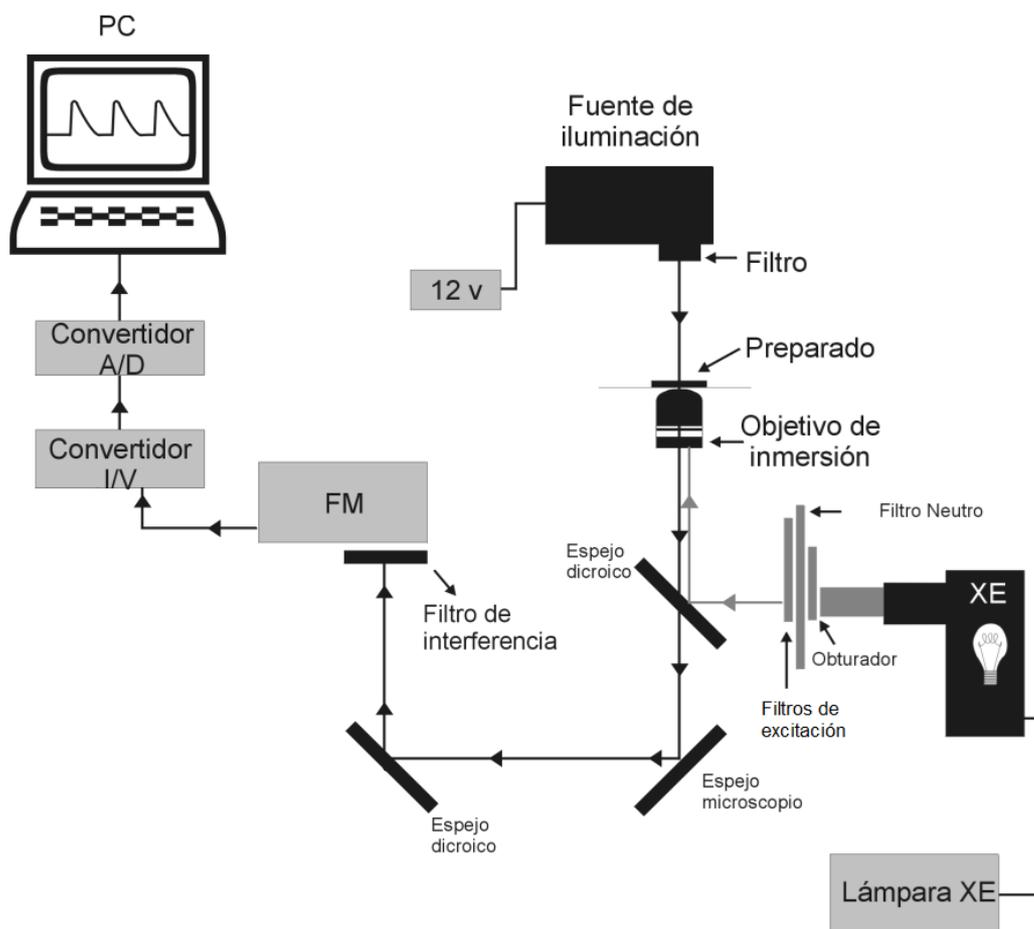


Figura 15. Esquema que muestra los componentes elementales del sistema de microscopía adaptado para experimentos de fluorescencia. Convertidor A/D: analógico-digital; convertidor I/V: intensidad-voltaje; FM: Fotomultiplicador; XE: Xenón.

Se realizaron las mediciones del acortamiento celular y Ca^{2+} citosólico para evaluar en tiempo real el estado inotrópico y lusitrópico de los cardiomiocitos en condiciones basales y los cambios acontecidos en respuesta a los diferentes tratamientos. Los valores promedios de la amplitud de los transitorios de Ca^{2+}_i y del acortamiento celular se calcularon después de 5, 10 o 15 min de incubación con o sin IGF-1 (control) y se utilizaron como parámetros de la respuesta inotrópica. Además, se midió el tiempo al 50% de la relajación (o $t_{1/2}$) como parámetro de la velocidad de relajación, y la tasa de decaimiento de Ca^{2+} (también medida como $t_{1/2}$ en el transitorio de Ca^{2+}_i) para evaluar el efecto del IGF-1 y del entrenamiento crónico en la respuesta lusitrópica (figura 16). Los inhibidores farmacológicos, según correspondiera, se preincubaron 10 min antes de IGF-1.

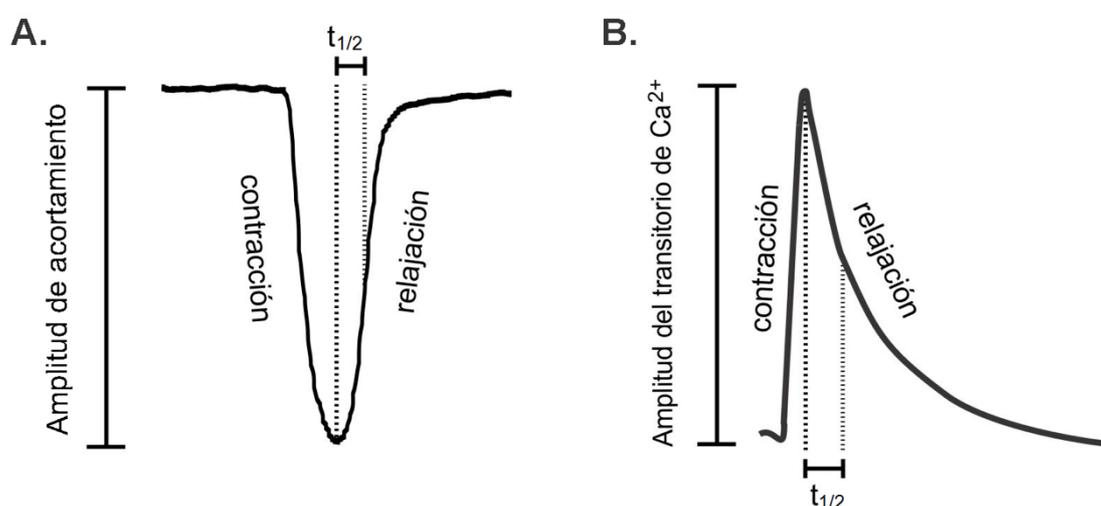


Figura 16. Parámetros contráctiles evaluados. Representación gráfica de un registro de acortamiento celular (A) y de un transitorio de Ca^{2+} (B), y los parámetros de contractilidad cardíaca medidos para cada caso. $t_{1/2}$: tiempo al 50% o la mitad de la relajación.

7. Estimación del contenido luminal de Ca^{2+} en el RS

La cantidad total de Ca^{2+} contenida dentro del RS de un cardiomiocito (“SR calcium load”), fue estimada a partir de la amplitud del aumento de fluorescencia emitida por el Fura-2 (transitorio de Ca^{2+} inducido por la cafeína) luego de la aplicación rápida de un pulso de cafeína. Esta maniobra consiste en la administración de 10 mM de cafeína sobre las células, que provoca la liberación completa de las moléculas de Ca^{2+} contenidas dentro del RS (Bers DM 2001).

8. Medición de la producción intracelular de óxido nítrico

Los miocitos cardíacos de ratón se cargaron con 5 μM del indicador fluorescente DAF-FM durante 30 min a temperatura ambiente, y se obtuvieron imágenes por epifluorescencia en un microscopio confocal invertido Zeiss 410 (LSM Tech, Pennsylvania, EE.UU.). La excitación a 488 nm fue proporcionada por un láser de argón y la emisión se recogió en un rango de 510-530 nm por un fotomultiplicador

(Sepulveda M y col. 2013). Se tomaron fotografías cada 1 min, durante 18 min. En ausencia de cualquier fármaco (control) o estimulado con IGF-1 (10 nM). Los inhibidores, cuando se indicaron, se preincubaron 10 min antes de IGF-1. Se utilizó el software Image J para el análisis. Los resultados se expresaron como porcentaje de cambio con respecto a tiempo cero (antes de IGF-1).

9. Corazones perfundidos de ratón

Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (35 mg/kg), comprobándose el arribo al plano profundo de anestesia a través de la pérdida del reflejo podal y corneal. Luego, se heparinizaron por la misma vía (200 U/ml) para evitar la formación de coágulos en el corazón. Se realizó una toracotomía, se aisló la aorta y se cortaron las conexiones cardíacas liberando al corazón de grasa y tejido conectivo. El corazón se extrajo rápidamente para evitar el deterioro del preparado. La aorta se ligó con hilo de lino a una cánula colocada en un sistema de perfusión retrógrada tipo Langendorff (figura 17). El corazón se perfundió con una solución de Ringer compuesta por: ClNa 120 mM, Cl₂Ca 1.35 mM, ClK 4.7 mM, SO₄Mg 1.2 mM, HCO₃Na 20 mM y Glucosa 11.1 mM, la cual fue termostatzada a 37°C y equilibrada con una mezcla gaseosa de 95% O₂ y 5% CO₂, para obtener un valor de pH de aproximadamente 7.4 (Vila Petroff MG y col. 2007).

El protocolo experimental (modelo *ex vivo*) consistió en la perfusión de corazones de ratón a flujo coronario constante (3 ml/min) durante 15 min en el equipo de Langendorff, en presencia o ausencia de IGF-1, con o sin el agregado del antagonista del IGF-1R (AG-1024) o del inhibidor específico de nNOS (NG). En este caso, para los grupos IGF-1+AG o IGF-1+NG, los inhibidores farmacológicos se preincubaron 10 min antes del agregado de IGF-1. Por otro lado, se perfundieron corazones murinos con el agregado de un donante exógeno de NO (SNAP). Finalizados ambos protocolos, los corazones de estos animales se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para los ensayos bioquímicos.

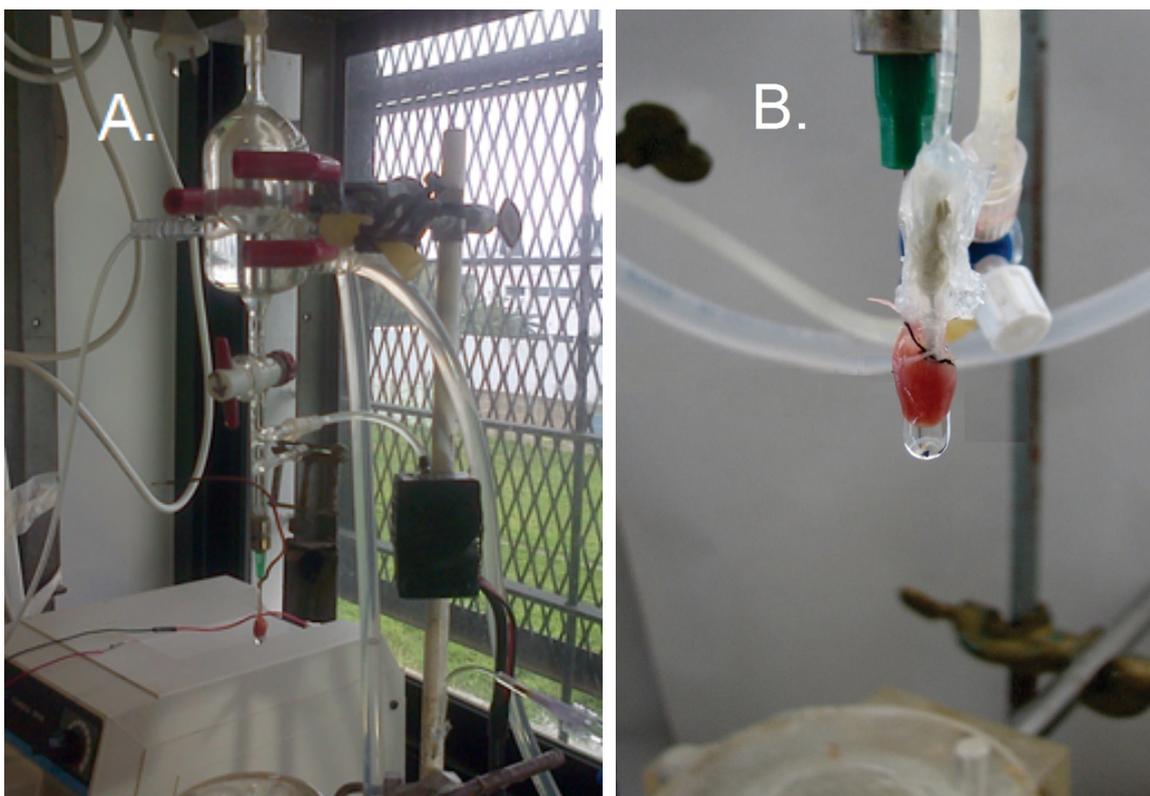


Figura 17. Imágenes fotográficas del corazón montado en un sistema de Langendorff y perfundido en forma retrógrada a través de la aorta. Los corazones fueron perfundidos durante 15 minutos con el agregado de IGF-1 o SNAP, a flujo coronario constante, para su posterior análisis bioquímico. En las fotografías se visualiza el equipo de perfusión de Langendorff (A) con el corazón de ratón montado mediante la canulación de la aorta (B).

10. Inmunodetección por análisis de Western blot

Posteriormente, el tejido ventricular pulverizado se resuspendió en 4 volúmenes de buffer de lisis RIPA, suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas, ortovanadato de sodio y fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) y se disgregó utilizando un homogeneizador (Politron, Brinkman Instruments). Todo el procedimiento se realizó a 4°C en hielo.

Se centrifugaron los homogenatos, una vez trasvazados a tubos Eppendorf, a 13000 rpm por 10 min, y se fraccionó el sobrenadante en alícuotas para conservarlo a -80°C. La concentración proteica fue determinada por el método de Bradford (Bradford MM 1976). Se sembraron cantidades iguales de proteínas (80-100 µg), se corrieron en un gel de poliacrilamida SDS al 10% (con una relación acrilamida/bisacrilamida 30:1), siguiendo la técnica descrita por Porzio y Pearson (Porzio MA y Pearson MA 1977). La composición del gel de resolución fue la siguiente: Tris/Glicina 400 mM (1:3) pH: 8.8; Glicerol 5%; SDS 0.1% y EDTA 0.2 mM. La formulación del gel de apilamiento fue: acrilamida 4%, Tris-HCl 125 mM pH 6.8 y SDS 0.1%. Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante (120 V) en buffer de corrida que contiene Tris 50 mM,

Glicina 150 mM y SDS 0.1% (pH 8.3).

A continuación las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P, Millipore), en presencia del buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y metanol 10%) a voltaje constante (12 V) durante una hora. Las membranas fueron bloqueadas con buffer Tris-salino o TBS (Tris 50 mM, ClNa 150 mM, pH 7.4) con 5% de leche descremada durante 1 hora, con o sin el agregado de 0.1% de detergente Tween según los distintos anticuerpos. Posteriormente, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos contra los siguientes residuos o sitios específicos: fosfo-Ser473 de la proteína quinasa B (P-AKT, 1:1000; Cell Signaling), NO sintasa neuronal o nNOS (NOS1, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology), fosfo-Ser1417 de la nNOS (P-NOS1, 1:2000; Abcam), fosfo-Thr286 de la CaMKII (P-CaMKII, 1:1000; Abcam), fosfo-Thr17 de la PLN (P-Thr17, 2:500; Badrilla) y fosfo-Ser16-PLN (P-Ser16, 2:500; Millipore). Se utilizó la detección de GAPDH (1:10000; Santa Cruz Biotechnology) como control de carga.

En particular, para la detección de la forma fosforilada del receptor de RyR2 en el sitio Ser2814 se llevó a cabo del siguiente modo: 120 µg de proteínas con un volumen apropiado de buffer se muestra se separaron en geles de poli(acrilamida)-SDS preparados según la técnica de Laemmli (Laemmli UK 1970), utilizando un porcentaje de acrilamida de 3% para el gel apilador y 6% para el gel separador. La corrida electroforética transcurrió a voltaje constante de 120V. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (transferencia húmeda a 25 V y a 4°C durante 15 hs); luego las membranas se bloquearon con buffer TBS-5% leche descremada y 0,1% Tween 20 durante 1 hora y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario contra el RyR2 fosforilado en Ser2814 (P-Ser2814, 1:5000; Badrilla).

A continuación se usaron anticuerpos secundarios conjugados para verificar la inmunoreactividad. Las bandas se visualizaron mediante un kit de detección de quimioluminiscencia basado en peroxidasa (ECL, Immobilon Western Millipore) utilizando un sistema de imágenes Chemidoc Station. La intensidad de la señal de las mismas en las inmunotransferencias se cuantificó mediante densitometría utilizando el software Image J (NIH, EE.UU.).

11. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real

La expresión de ARNm del péptido natriurético cerebral (BNP) y de nNOS se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real y se normalizaron a GAPDH siguiendo el procedimiento descrito previamente (Garciaarena CD y col. 2009). En resumen, se aisló el ARN total del tejido cardíaco de ratón usando Trizol TM Reagent (Invitrogen). El ARN (0.8 µg) se transcribió de forma inversa usando la transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen). Se utilizó una

dilución del ADNc resultante para cuantificar el contenido relativo de ARNm mediante PCR en tiempo real (sistema de detección de PCR en tiempo real iCycler iQ, Bio-Rad) usando primers apropiados y SYBR Green como sonda fluorescente. Se diseñaron los siguientes primers, utilizando el software Primer3: 5'-GCTGTAACGCACTGAAGTTGT-3' (directo) y 5'-TCAAAGGTGGTCCCAGAGCT-3' (inverso) para BNP; 5'-CAACAGCGTCTCCTATTC-3' (directo) y 5'-CGAAGACTGAGAACCTCACATT-3' (inverso) para nNOS; 5'-CATGGCCTCCGTGTTCTTA-3' (directo) y 5'-TGCTTCACCACCTTCTTGATG-3' (inverso) para GAPDH; utilizados para la medición de la expresión génica.

12. Reactivos y drogas

Todos los fármacos utilizados en el presente estudio fueron reactivos analíticos. El factor de crecimiento recombinante de tipo 1 de insulina de ratón (IGF-1, 10 nM, nº Cat PMG0075 de Gibco by Life Technologies); el antagonista del IGF-1R (AG-1024, 100 nM, nº Cat sc-205907 de Santa Cruz Biotechnology); el inhibidor de AKT (MK-2206, 500 nM, nº Cat #S1078 de Selleck Chemicals); el inhibidor de CaMKII o (KN-93, 2.5 µM, nº Cat 422708 de Calbiochem); el inhibidor de la nNOS o nitroguanidina (NG, 240 nM, nº Cat 490070 de Calbiochem); el inhibidor de las NOS o éster metílico de nitro-1-arginina (L-NAME, 2.5 mM, nº Cat N5751 de Sigma); la colagenasa tipo II (300 U/ml, de Worthington Biochemical); el donante de NO (SNAP, 1 µM, nº Cat N° 3398 de Sigma); el indicador sensible a Ca²⁺ (Fura-2 AM, 10 µM, nº Cat F1221); y el indicador fluorescente de NO (Diacetato DAF-FM, 5 µM, nº Cat D23844 de Thermo Fisher Scientific). KN-93, MK-2206, AG-1024, Fura-2 AM y DAF-FM se diluyeron en DMSO (concentración final ≤ 0.01%).

13. Análisis estadístico

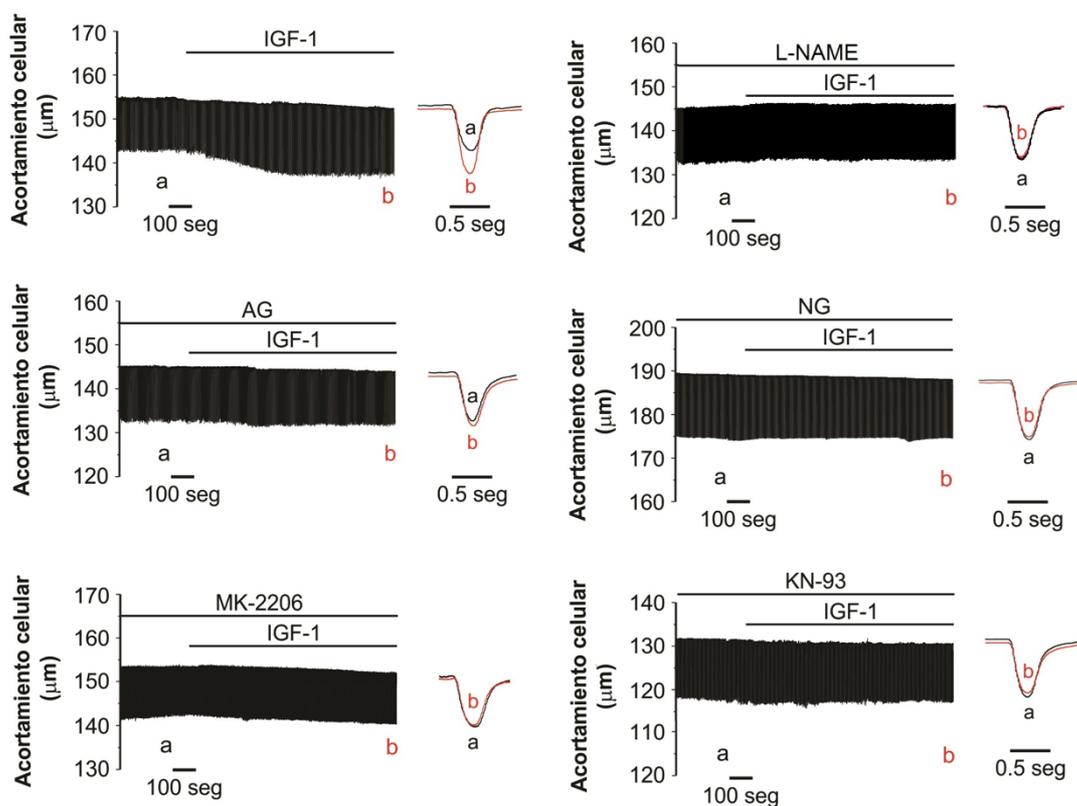
Los datos fueron expresados como media ± error estándar. Para comparar grupos de valores con n (número de células cardíacas) o N (número de corazones) >4, se utilizó test de Student en caso de dos muestras, y el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el post-test de Newman-Keuls para comparar más de dos muestras. Cuando los grupos de valores tuvieron un n/N ≤ 4 se los analizó por test estadísticos no paramétricos, Mann-Whitney o Krustal-Wallis según correspondía. En todos los casos se consideró un valor de p<0.05 como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. El IGF-1 produce un efecto inotrópico y lusitrópico positivo por un mecanismo dependiente de óxido nítrico y CaMKII en cardiomiocitos ventriculares aislados de ratón

En primer lugar, se evaluó el efecto agudo del IGF-1 sobre la amplitud del acortamiento de cardiomiocitos ventriculares aislados de ratón, marcapaseados para contraerse a 0.5 Hz. La perfusión de los miocitos con IGF-1 (10 nM) aumentó la amplitud de acortamiento celular, alcanzando su máximo a los 15 min de incubación, tal como se puede apreciar en los registros típicos y resultados promedio mostrados en las figuras 18 A y B. Consistentemente, el aumento de la contractilidad o efecto inotrópico positivo (EIP) se previno por la inhibición del receptor de IGF-1 (IGF-1R) con AG-1024 (100 nM), así como de la quinasa AKT con MK-2206 (500 nM). Para dilucidar el mecanismo subcelular involucrado, y siendo que las NO sintetas (NOS) son blancos bien reconocidos de AKT, se examinó el efecto de IGF-1 sobre el acortamiento celular no sólo en presencia de L-NAME (2.5 mM), un inhibidor no selectivo de todas las isoformas de las NOS, sino también luego del bloqueo específico de la isoforma neuronal de NOS (nNOS o NOS1) con nitroguanidina (NG, 240 nM). Bajo estas condiciones experimentales, la respuesta inotrópica positiva de IGF-1 se atenuó significativamente. Por otra parte, se obtuvieron resultados similares cuando la CaMKII, blanco recientemente reconocido del NO, se inhibió utilizando el agregado de KN-93 (2.5 μ M). De esta manera, no solo se demuestra que IGF-1 promueve un EIP en cardiomiocitos ventriculares de ratón adulto, sino que a su vez requiere de la activación de la nNOS y de CaMKII.

A



B

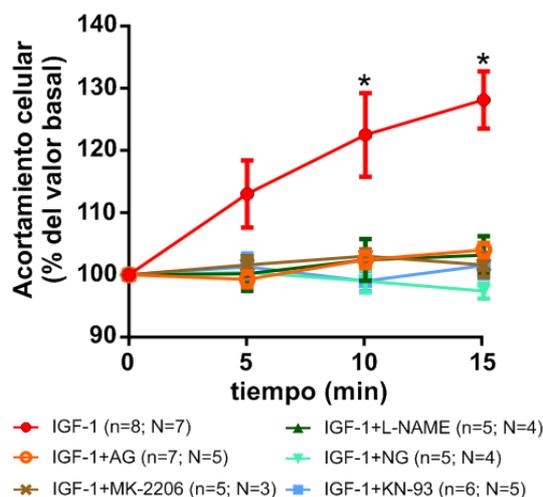


Figura 18. El IGF-1 produce un efecto inotrópico positivo (EIP) que depende de la activación de nNOS y CaMKII. A. Registros representativos de acortamiento celular en función del tiempo de cardiomiocitos aislados, mostrando el efecto de IGF-1 (10 nM) en ausencia y presencia del antagonista del receptor de IGF-1, AG-1024 (AG); del inhibidor de AKT, MK-2206; del inhibidor nNOS, nitroguanidina (NG); y del inhibidor de CaMKII, KN-93. A la derecha de cada registro continuo, se muestran superpuestos los registros de acortamiento celular individuales antes (a) y después (b) del tratamiento con IGF-1. **B.** Resultados promedio de acortamiento celular para todos los grupos experimentales expuestos a IGF-1 a los 15 min. *Indica $p < 0.05$ vs todos los grupos, ANOVA.

Como se puede observar en la figura 19, ninguno de estos inhibidores afecta la contractilidad basal cuando se añaden en ausencia de IGF-1. Las células control no tratadas con IGF-1, no mostraron cambios significativos en la amplitud de acortamiento celular durante el mismo período experimental que las que fueron expuestas a IGF-1.

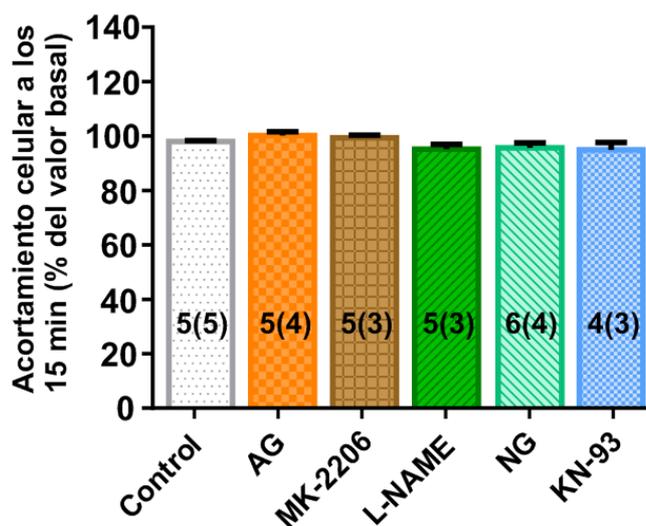


Figura 19. Efecto de los inhibidores farmacológicos, en ausencia de IGF-1, sobre el acortamiento celular respecto del valor basal. El número de células n y de corazones (N) para cada grupo experimental se representa dentro de las barras.

Por otra parte, para evaluar el efecto del IGF-1 sobre la relajación o la respuesta lusitrópica medimos el tiempo hasta la mitad de la relajación celular (figura 20). Como se muestra en los resultados promedio, la exposición con IGF-1 durante 15 min produjo una disminución de este parámetro, es decir, promovió la aceleración de la relajación cardíaca, que pudo ser prevenido con el agregado de los distintos inhibidores para IGF-1R, AKT, NOS, nNOS y CaMKII (AG, MK-2206, L-NAME, NG y KN-93, respectivamente).

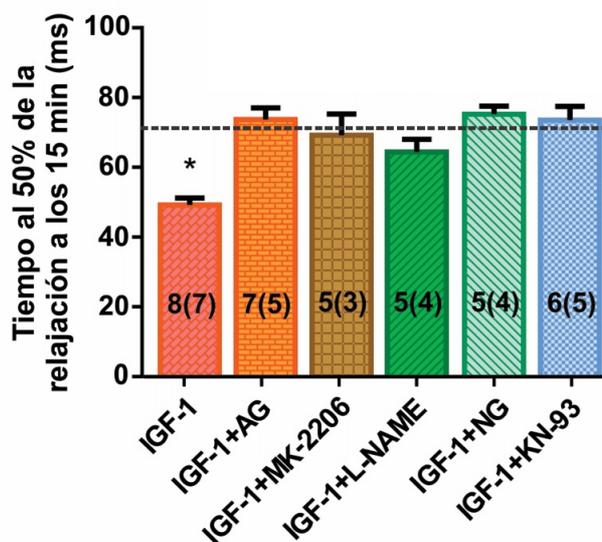


Figura 20. El IGF-1 produce un efecto lusitrópico positivo (ELP) dependiente de la activación de nNOS y CaMKII. Resultados promedio del tiempo al 50% de la relajación ($t_{1/2}$) para todos los grupos experimentales expuestos a IGF-1 durante 15 min. La línea punteada corresponde al valor del tiempo a la mitad de la relajación para el grupo control. El número de células n y de corazones (N) para cada grupo experimental se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$ vs todos los grupos, ANOVA.

Además, como se visualiza en la figura 21, los inhibidores farmacológicos no afectaron el valor basal de este parámetro ($t_{1/2}$) a lo largo del protocolo experimental.

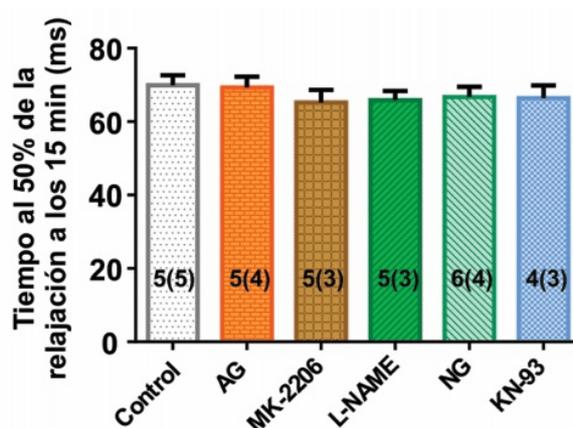


Figura 21. Los inhibidores farmacológicos sin el agregado de IGF-1 no afectaron el tiempo a la mitad de la relajación respecto del valor basal. Los inhibidores farmacológicos por sí solos, en ausencia de IGF-1, no tuvieron efecto sobre el tiempo al 50% de la relajación ($t_{1/2}$). El número de células n y de corazones (N) para cada grupo experimental se representa dentro de las barras.

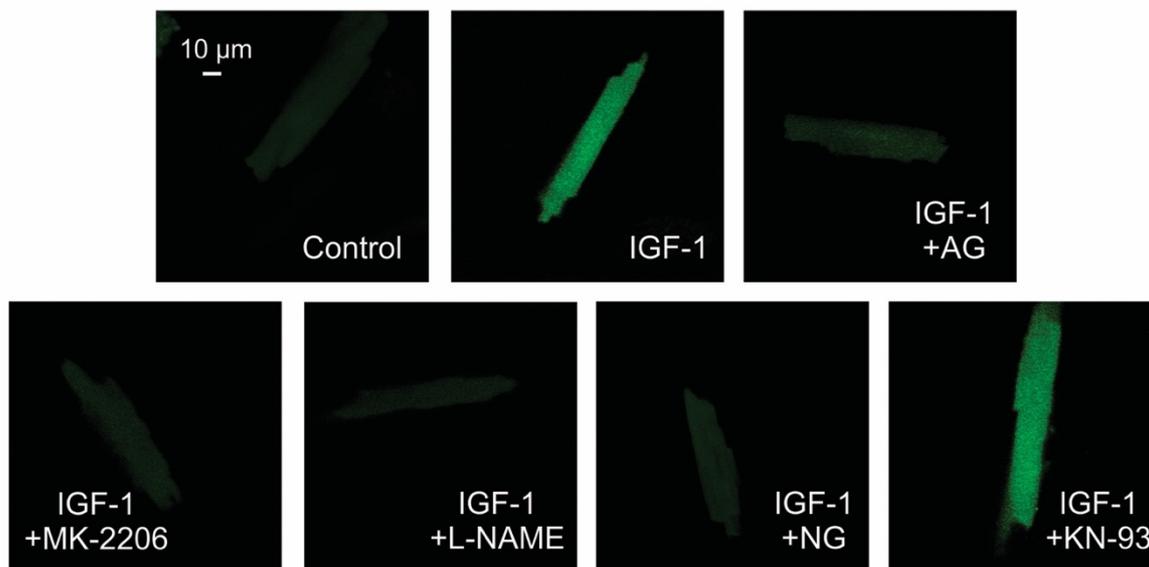
Los resultados parciales de estos experimentos indican que el tratamiento agudo con IGF-1 promueve una respuesta inotrópica y lusitrópica positiva (EIP y ELP, respectivamente), por un mecanismo que depende de la activación de nNOS y de la CaMKII en cardiomiocitos aislados de ratón.

2. El IGF-1 estimula la producción de óxido nítrico por nNOS de manera independiente de CaMKII

Por otra parte, para confirmar que el IGF-1 promueve el aumento de NO en cardiomiocitos aislados de ratón adulto, se evaluó la producción de NO por epifluorescencia utilizando el indicador sensible a NO, DAF-FM. Los cambios registrados en la fluorescencia son considerados como una medida del cambio de NO intracelular. La figura 22A muestra imágenes representativas de miocitos cargados con DAF-FM. La perfusión de los cardiomiocitos con IGF-1 aumentó la señal fluorescente dependiente de NO, efecto que se atenuó significativamente por el bloqueo de IGF-1R, AKT, NOS y nNOS, con AG-1024, MK-2206, L-NAME y NG, respectivamente. Los resultados promedio de estos experimentos mostrados en la figura 22B sugieren que la nNOS es la principal isoforma involucrada en la síntesis de NO inducida por la administración aguda de IGF-1, de manera dependiente de AKT. Por otra parte, la inhibición de CaMKII no previno el aumento de la producción de NO dependiente de IGF-1, lo que demuestra que, si el NO y CaMKII fueran componentes de la misma cascada, CaMKII debería estar en un eslabón posterior al NO en la cadena de señalización.

A

Fluorescencia de DAF-FM



B

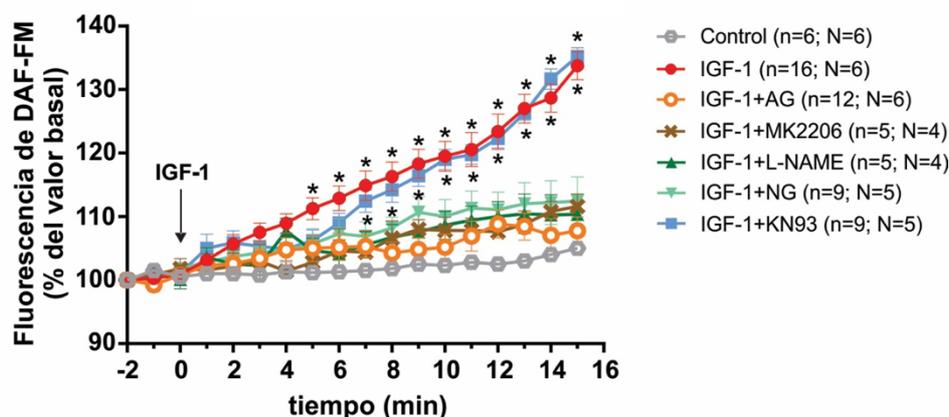


Figura 22. El IGF-1 estimula la producción de NO en cardiomiocitos de ratón adulto de manera dependiente de la isoforma nNOS. **A.** Imágenes representativas de los cardiomiocitos cargados con el indicador fluorescente DAF-FM sensible al NO y expuestos a IGF-1 en ausencia o presencia de los diferentes inhibidores. **B.** Resultados promedio del curso en el tiempo de la fluorescencia de DAF-FM durante 15 min de incubación con IGF-1 para los diferentes grupos experimentales. El aumento en la fluorescencia de DAF-FM inducido por IGF-1 no se previno con el agregado del inhibidor de CaMKII, pero sí con la adición de los bloqueantes de IGF-1R, AKT, NOS y nNOS (AG-1024, MK-2206, L-NAME y NG, respectivamente). El número de células n y de corazones (N) para cada grupo experimental se detallan dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$ vs los valores basales inmediatamente antes de la administración de IGF-1, ANOVA.

Por su parte, como se desprende de los resultados promedio de fluorescencia de DAF-FM de la figura 23, la síntesis basal de NO no se modificó por el uso de diferentes inhibidores farmacológicos específicos en ausencia del agregado exógeno de IGF-1.

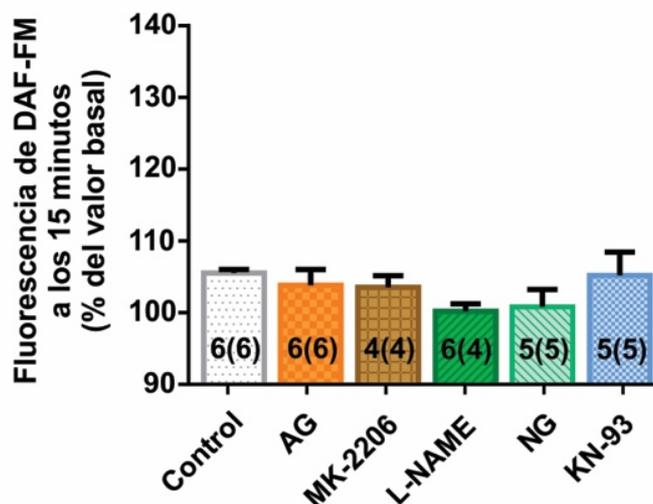


Figura 23. Los inhibidores farmacológicos por sí solos no tuvieron efecto sobre la fluorescencia de DAF-FM respecto del valor basal. Los inhibidores farmacológicos utilizados no afectan la producción intracelular de NO de cardiomiocitos aislados de ratón, en ausencia de IGF-1. El número de células *n* y de los respectivos corazones (*N*) para cada grupo experimental se detallan dentro de las barras.

Estos resultados demuestran que la administración aguda de IGF-1 en cardiomiocitos aislados de ratón adulto estimula, de manera dependiente de AKT, la producción de NO mediada por la nNOS. Además, los resultados muestran que la CaMKII no participaría en la síntesis de NO inducida por IGF-1.

3. Vía de señalización intracelular inducida por IGF-1 en corazones perfundidos de ratón

Para una mejor caracterización de los resultados mostrados, realizamos ensayos bioquímicos en homogenatos de corazones perfundidos de ratón, mediante la técnica de inmunodetección o Western Blot (WB). Estos experimentos ilustrados en la figura 24, muestran que el IGF-1 promueve la fosforilación de residuos o sitios específicos que conducen a la activación de AKT y nNOS (o NOS1) a través de un mecanismo dependiente de IGF-1R (figura 24 A y B, respectivamente).

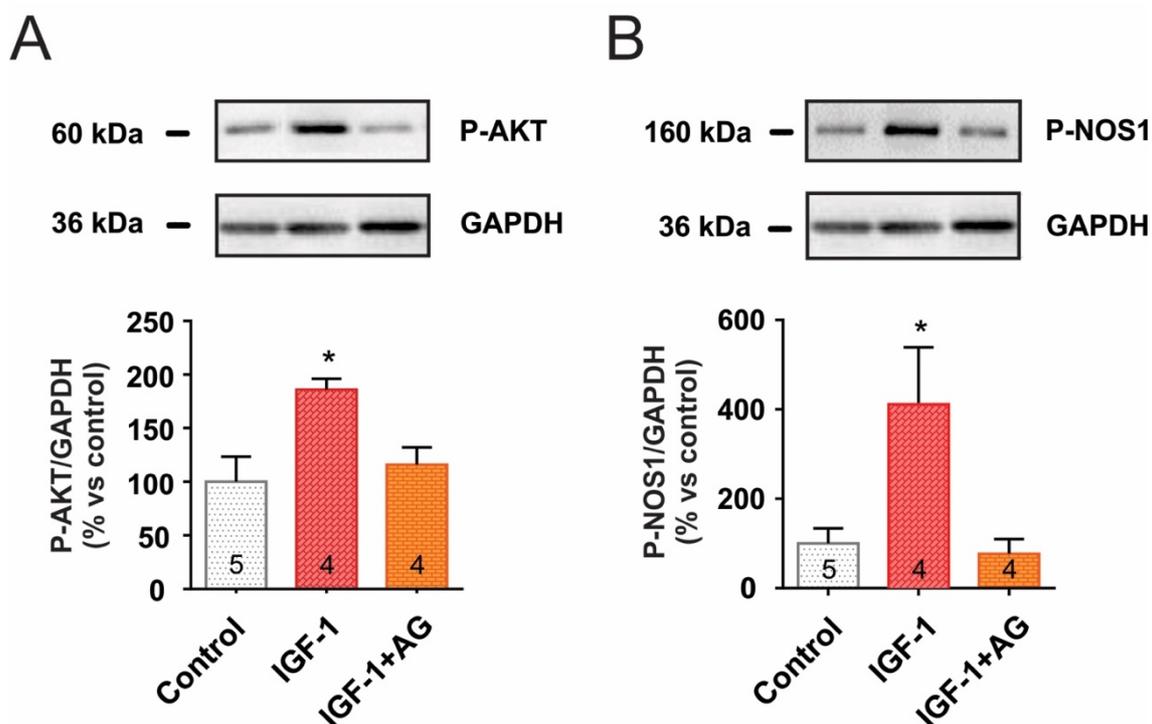


Figura 24. El IGF-1 aumenta la actividad de AKT y nNOS. Fotografías de los westerns blots representativos y los datos promedios que muestran que IGF-1 induce tanto la fosforilación de AKT (**A**) como la nNOS (NOS1) (**B**), a través de un mecanismo dependiente del receptor de IGF-1 (IGF-1R). La normalización de la carga se realizó con la medición de la expresión GAPDH. El número de corazones *N* evaluados en cada grupo experimental se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$ vs todos los grupos, ANOVA.

Por otra parte, para examinar si un aumento de la transcripción de nNOS también contribuye a la producción incrementada de NO, se cuantificó la abundancia de su ARN mensajero (ARNm) por retrotranscripción seguido de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), así como de la expresión de la proteína total específica medido por WB. Como se observa en la figura 25 A y B, el IGF-1 no afectó la expresión de la nNOS, sugiriendo que el aumento en la producción de NO inducida por IGF-1 sería debido a una modificación post-traduccional de la enzima y no a un incremento en su expresión.

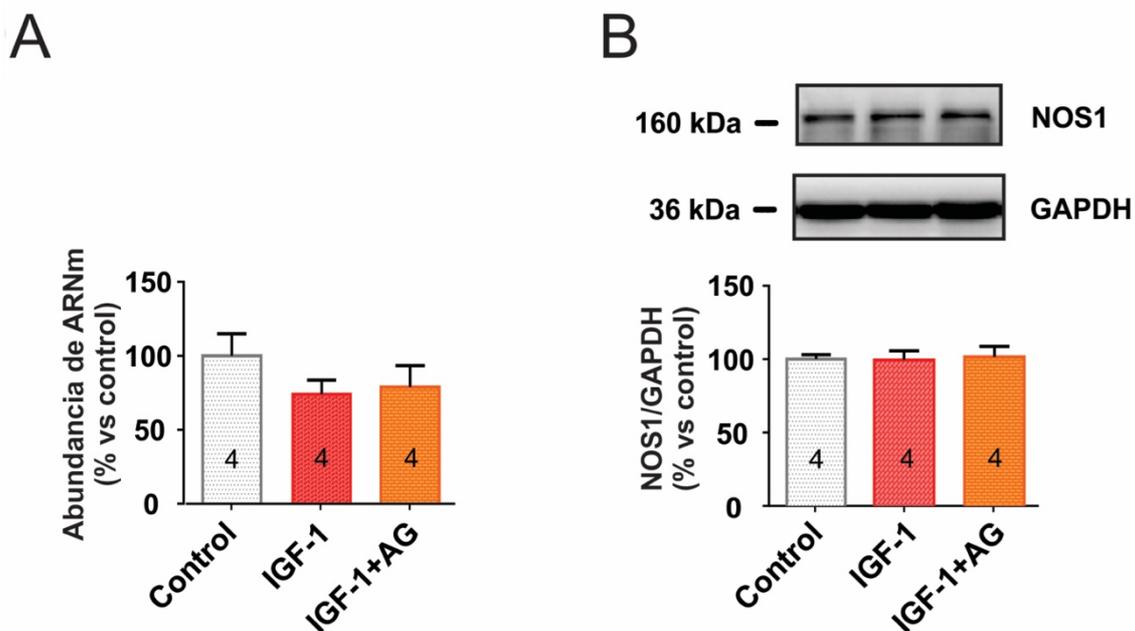


Figura 25. El tratamiento agudo con IGF-1 no modificó la expresión de nNOS. La abundancia del ARNm de NOS1 (nNOS) se cuantificó por RT-PCR en tiempo real demostrando que el IGF-1 no regula esta enzima mediante un cambio en su expresión (**A**). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la expresión de la proteína NOS entre los distintos grupos experimentales (**B**). El número de corazones *N* evaluados en cada grupo se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$ vs todos los grupos, ANOVA.

Para una mayor comprensión de la cascada de señalización subyacente al EIP y ELP del IGF-1, se evaluó la activación de CaMKII mediante la determinación de su autofosforilación y la fosforilación de su sustrato específico, el residuo Thr17 de PLN. El IGF-1 aumentó significativamente la fosforilación de ambas proteínas, efecto que fue cancelado no sólo por el bloqueo de IGF-1R con AG sino también por la inhibición de nNOS (NOS1) con NG (figura 26 A y B). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la fosforilación del residuo Ser2814 de RyR2 (figura 26C), otro blanco reconocido de CaMKII, lo que sugiere que el EIP y ELP sería independiente de una modificación en la actividad del RyR2. Bajo estas condiciones experimentales, tampoco se detectaron diferencias significativas en la fosforilación de Ser16 de PLN (figura 26D), blanco de PKA. De esta manera, la adaptación contráctil inducida por IGF-1 tampoco sería dependiente de la actividad de PKA.

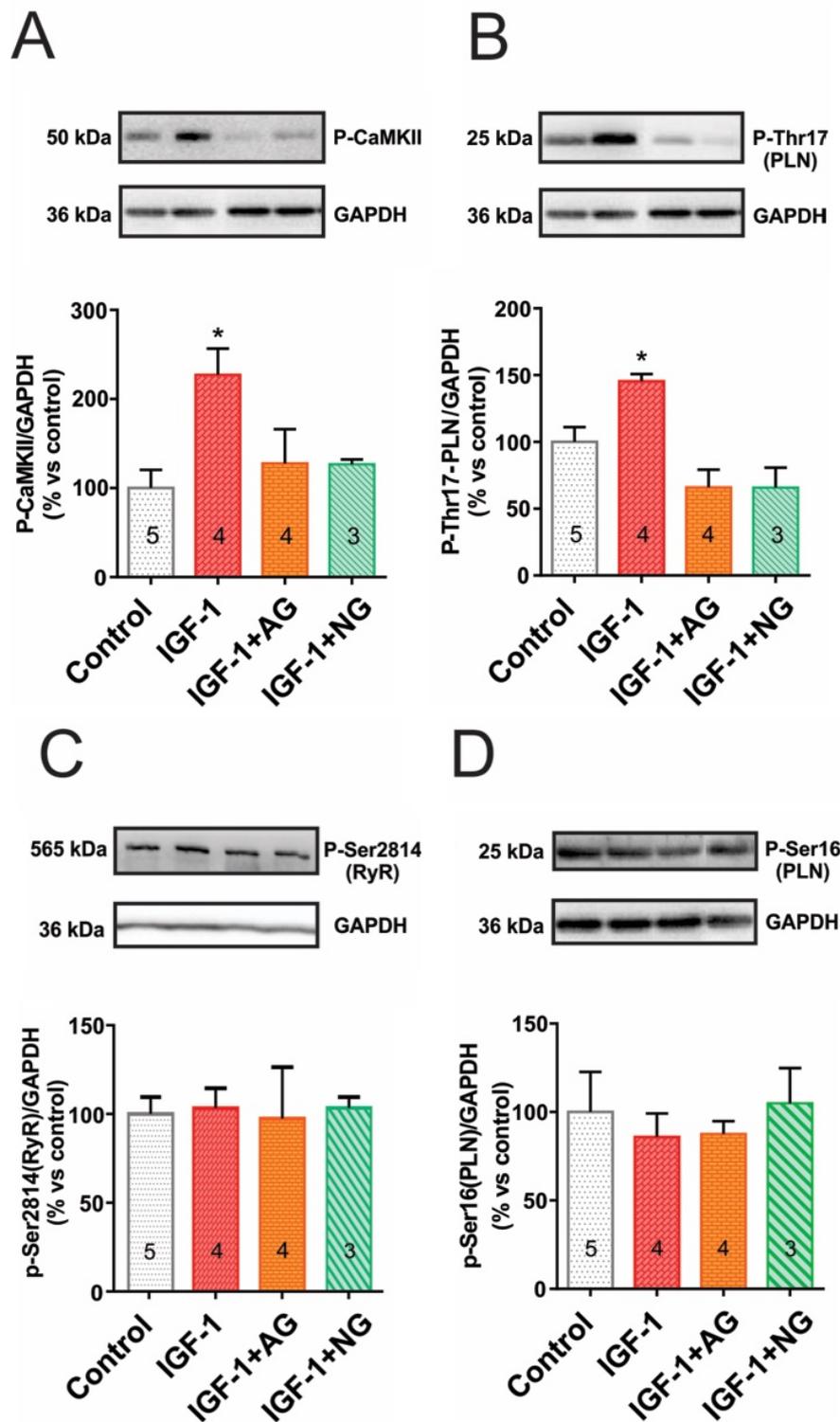


Figura 26. El IGF-1 activa CaMKII de una manera dependiente de nNOS y mejora el manejo de Ca^{2+} del RS. Western blots representativos y resultados promedios que muestran el efecto de IGF-1 sobre la fosforilación de CaMKII (A), treonina 17 de PLN (Thr 17-PLN) (B) y serina 2814 del RyR2 (Ser2814-RyR2) (C), ambos sustratos específicos de CaMKII, y serina 16 de PLN (Ser16-PLN) (D); en ausencia y presencia de AG-1024 (AG) y nitroguanidina (NG). IGF-1 aumentó P-CaMKII y P-Thr17-PLN, sólo en ausencia de AG o NG. Además, no se observaron diferencias en P-Ser2814-RyR2 y en la fosforilación del blanco específico de PKA, Ser16 de PLN. El número de corazones N evaluados para cada grupo experimental se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$ vs todos los demás grupos, ANOVA.

Los resultados que muestran que la activación de CaMKII por IGF-1 puede ser prevenida al inhibir la nNOS (figura 26A), sumados a los observados en la figura 22 que evidencian que un aumento en la síntesis de NO inducida por IGF-1 no se previene al inhibir a la CaMKII, sugieren que la producción citosólica de NO y la activación de CaMKII corresponden a la misma cascada de señalización intracelular disparada por IGF-1, participando CaMKII corriente abajo del aumento de NO.

Para confirmar la capacidad del NO para activar a CaMKII, examinamos el efecto del donante de NO (SNAP) sobre la actividad de la quinasa.

Mediante experimentos bioquímicos de homogenatos de corazones murinos perfundidos con el agregado de 1 μ M del donante de NO (SNAP) se pudo corroborar el aumento significativo en la fosforilación de la quinasa y la de Thr17-PLN, evidenciando la activación directa de CaMKII por NO en estas condiciones (figura 27 A y B, respectivamente).

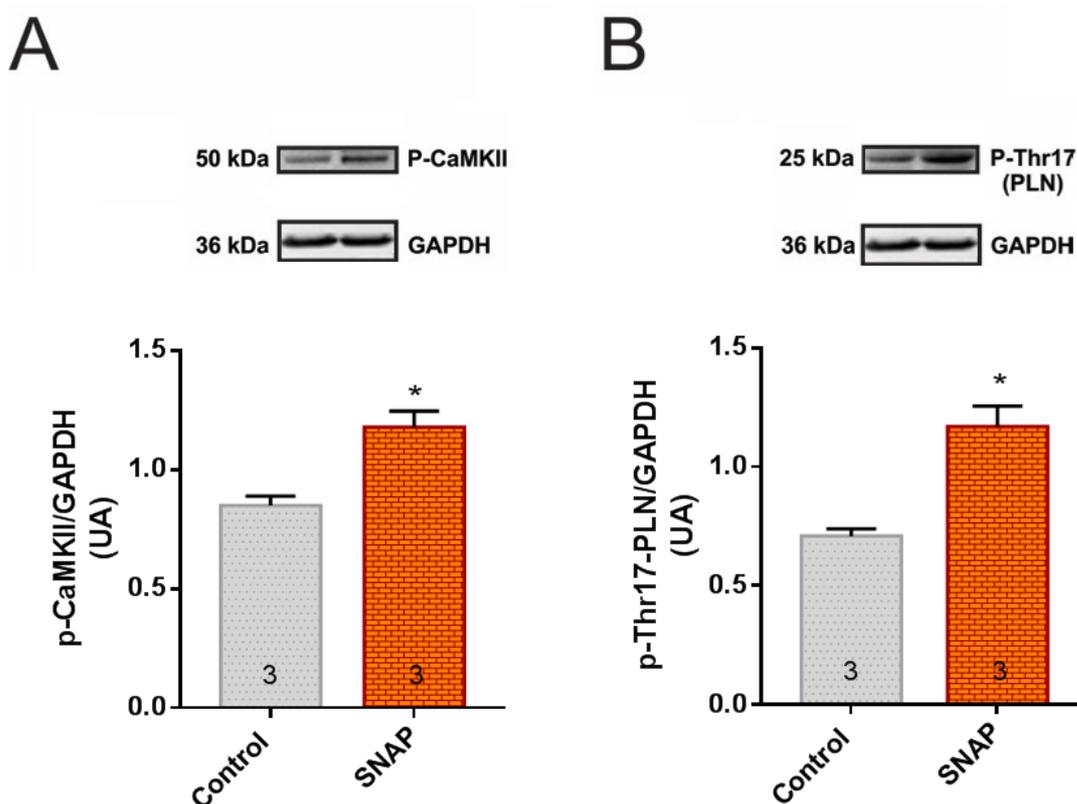


Figura 27. Efecto directo del donante de NO sobre la actividad de CaMKII en corazones perfundidos. Western blots representativos y resultados promedios que muestran el efecto de donante de NO (SNAP) sobre la fosforilación de CaMKII (A) y de su blanco específico en PLN, el residuo treonina 17 (Thr 17-PLN) (B) en corazones perfundidos. La fosforilación de CaMKII y Thr17-PLN se incrementó con el agregado del donante de NO (SNAP). El número de corazones N para cada grupo experimental se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$, t-test entre ambos grupos.

4. Rol crítico de CaMKII en la respuesta contráctil inducida por IGF-1 en cardiomiocitos de ratones transgénicos

A fin de confirmar la participación de CaMKII en el EIP y ELP del IGF-1, se realizaron experimentos en cardiomiocitos aislados de ratones transgénicos de la cepa AC3-I, que expresan un péptido inhibidor de la quinasa exclusivamente en el corazón, y de ratones controles AC3-C que expresan un péptido desordenado del inhibidor de CaMKII (scrambled). Como se muestra en los registros representativos de acortamiento celular en la figura 28A, el tratamiento agudo con IGF-1 aumentó la amplitud del acortamiento celular (resultados promedio en B) y la velocidad de relajación, medida como el tiempo que dura en llegar a la mitad de este período (resultados promedio en C) en los cardiomiocitos aislados de ratones AC3-C, mientras que este efecto no se observó en las células cardíacas de ratones AC3-I. Estos resultados sustentan el hecho de que el IGF-1 requiere de la activación de CaMKII para inducir el aumento de la respuesta inotrópica y lusitrópica.

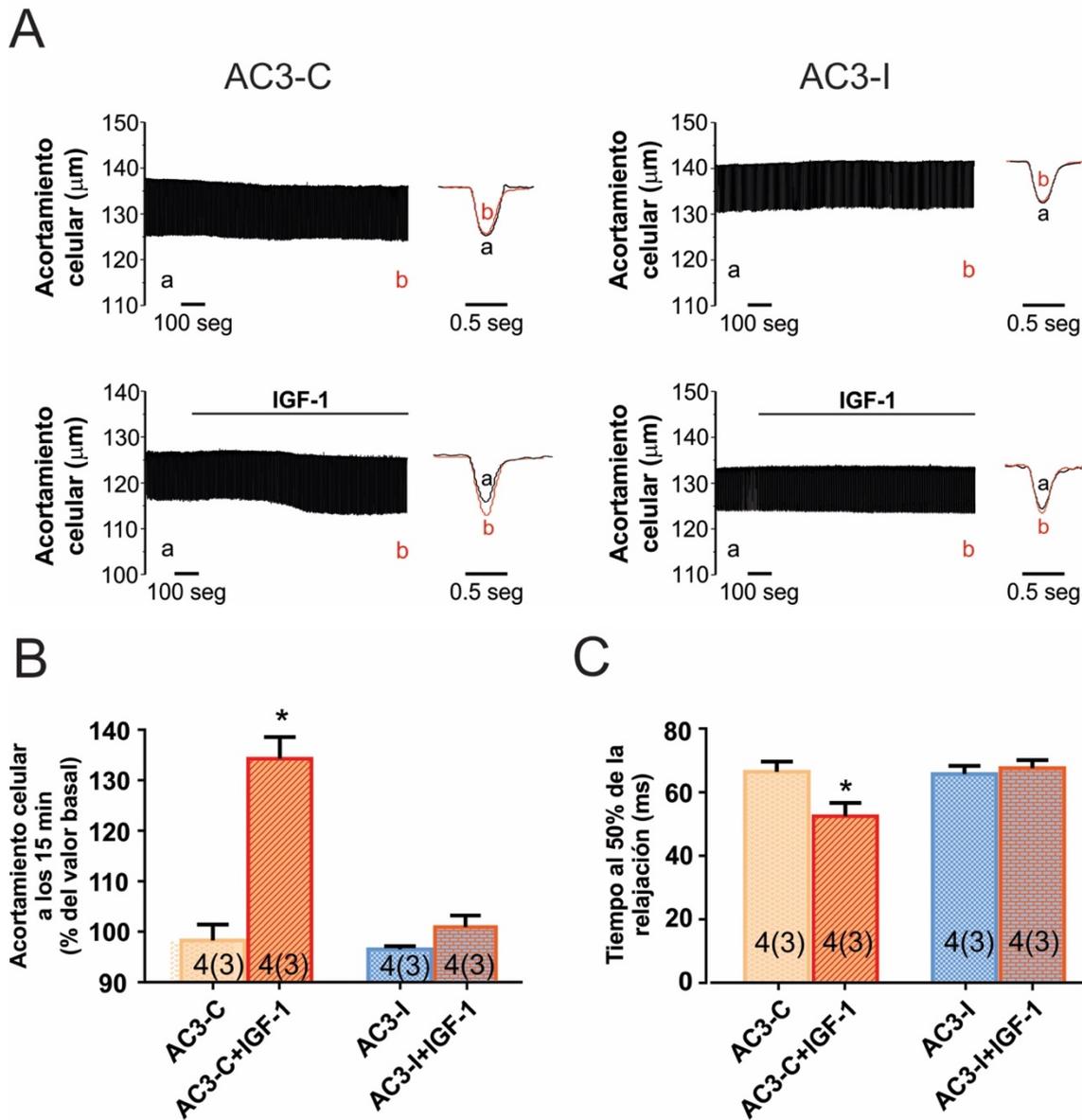


Figura 28. La expresión de un péptido inhibidor de CaMKII previene el EIP y el ELP del IGF-1. Los registros típicos de acortamiento celular (A) y los resultados promedios (B) muestran que el efecto inotrópico positivo de IGF-1 está presente en cardiomiocitos aislados de ratones transgénicos AC3-C control y ausentes en miocitos que expresan el péptido inhibidor de CaMKII (cepa AC3-I). Por su parte, en los miocitos AC3-C se redujo el tiempo al 50% de la relajación ($t_{1/2}$); no así en los miocitos AC3-I (C). El número de células n de sus respectivos corazones (N) para cada grupo experimental se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$ vs el grupo control (ausencia de IGF-1) para cada cepa, prueba t .

5. El IGF-1 aumenta el contenido de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático y la amplitud y velocidad de relajación del transitorio de Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados de ratón

Dado que se espera que la fosforilación de PLN dependiente de CaMKII aumente la actividad de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA2a), incrementando la velocidad de retoma y el contenido de Ca^{2+} del RS, y como resultado, el transitorio de Ca^{2+} , se examinó en miocitos aislados cargados con el indicador fluorescente sensible a Ca^{2+} (Fura-2), la amplitud y el tiempo al 50% de la caída de los transitorios de Ca^{2+} ($t_{1/2}$) expuestos a IGF-1. Tal como se observa en los registros representativos de las mediciones de Ca^{2+}_i en la figura 29A, el IGF-1 promovió un aumento significativo de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} , y redujo la velocidad de caída del transitorio de Ca^{2+} (figura 29 B y C, respectivamente). Además, se evaluó el contenido de Ca^{2+} a través de la administración de un pulso de cafeína (10 mM). La cafeína produce la liberación completa del contenido de Ca^{2+} del RS, siendo la amplitud del transitorio de Ca^{2+} inducido por cafeína un índice de la carga de Ca^{2+} del RS. Como se puede observar en la figura 29A y en los resultados promedio de la figura 29D, el IGF-1 aumentó la amplitud del transitorio de Ca^{2+} inducido por cafeína. Además, estos efectos se previnieron por el agregado de inhibidores específicos para IGF-1R, nNOS y CaMKII con AG, NG y KN-93 respectivamente.

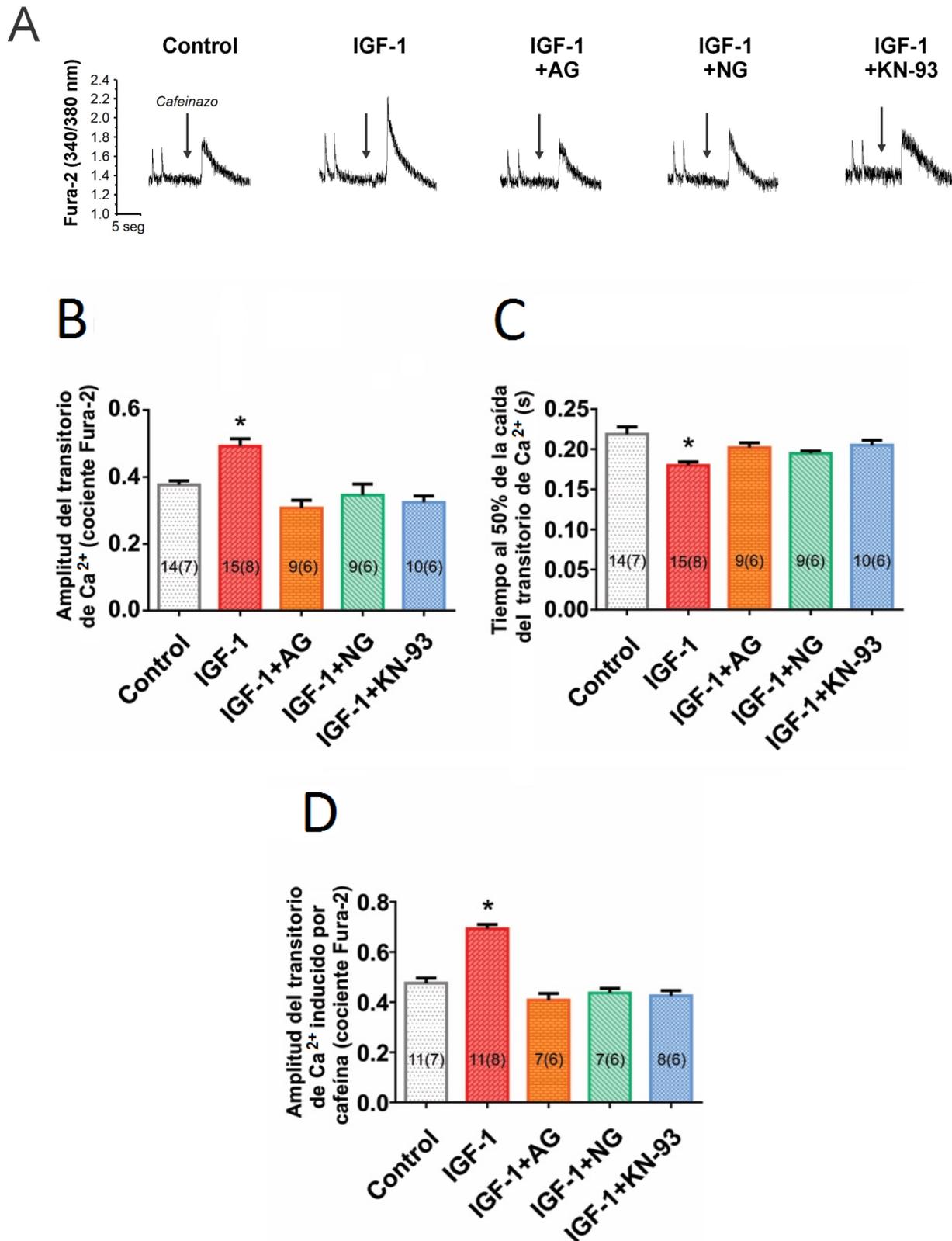


Figura 29. Efecto del IGF-1 sobre el transitorio de Ca^{2+} y el contenido de Ca^{2+} del RS. Registros representativos (A) y resultados promedio mostrando el efecto de IGF-1 sobre la amplitud y el tiempo al 50% ($t_{1/2}$) de relajación del transitorio de Ca^{2+} (B-C), y sobre la amplitud del transitorio Ca^{2+} inducido por cafeína (D), para cada grupo experimental, respectivamente. Efecto del IGF-1 sobre el contenido de Ca^{2+} del SR determinado por la amplitud del transitorio Ca^{2+} inducido por la cafeína. En los registros típicos se indica el pulso de cafeína o cafeinazo con una flecha. El número de células n y de corazones N, para cada grupo experimental se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$ vs todos los grupos, ANOVA.

6. El papel de CaMKII en la adaptación cardíaca al ejercicio físico aeróbico en ratones sometidos a una rutina de natación

Habiendo demostrado el papel clave desempeñado por la CaMKII en el EIP y ELP de IGF-1 en los cardiomiocitos aislados, se exploró su rol en el desarrollo de HC fisiológica en corazones de ratones silvestres C57 (WT) y ratones transgénicos con CaMKII inhibida (AC3-I). Para llevar a cabo este objetivo, los ratones fueron sometidos a 6 semanas de entrenamiento aeróbico por una rutina de natación. Al final de este período, se evaluó la masa cardíaca a través del cociente entre el peso del corazón y la longitud de la tibia (PC/LT) y del índice de masa ventricular izquierda (IMVI) determinado por ecocardiografía. En la figura 30 se muestra que los corazones de ratones sometidos al ejercicio, tienen aumentados los índices de hipertrofia (PC/LT e IMVI, en A y B respectivamente). Además, en el panel C de la figura 30, se analizaron cortes histológicos del miocardio constatando el aumento del tamaño de los cardiomiocitos evaluado por el área de sección transversal (CSA), sin la presencia de fibrosis (% de colágeno intersticial); característica propia de la HC fisiológica. Por otro lado, como se muestra en la figura 30D, no se observaron diferencias significativas en la expresión génica del péptido natriurético cerebral (BNP) entre los ratones sedentarios (Sed) y nadadores (Nad), cuya sobreexpresión es un marcador molecular de HC patológica. Finalmente, por mediciones ecocardiográficas, los corazones de los de los ratones nadadores mostraron un aumento en el porcentaje de la fracción de acortamiento (%FA) en comparación con los ratones sedentarios (figura 30E).

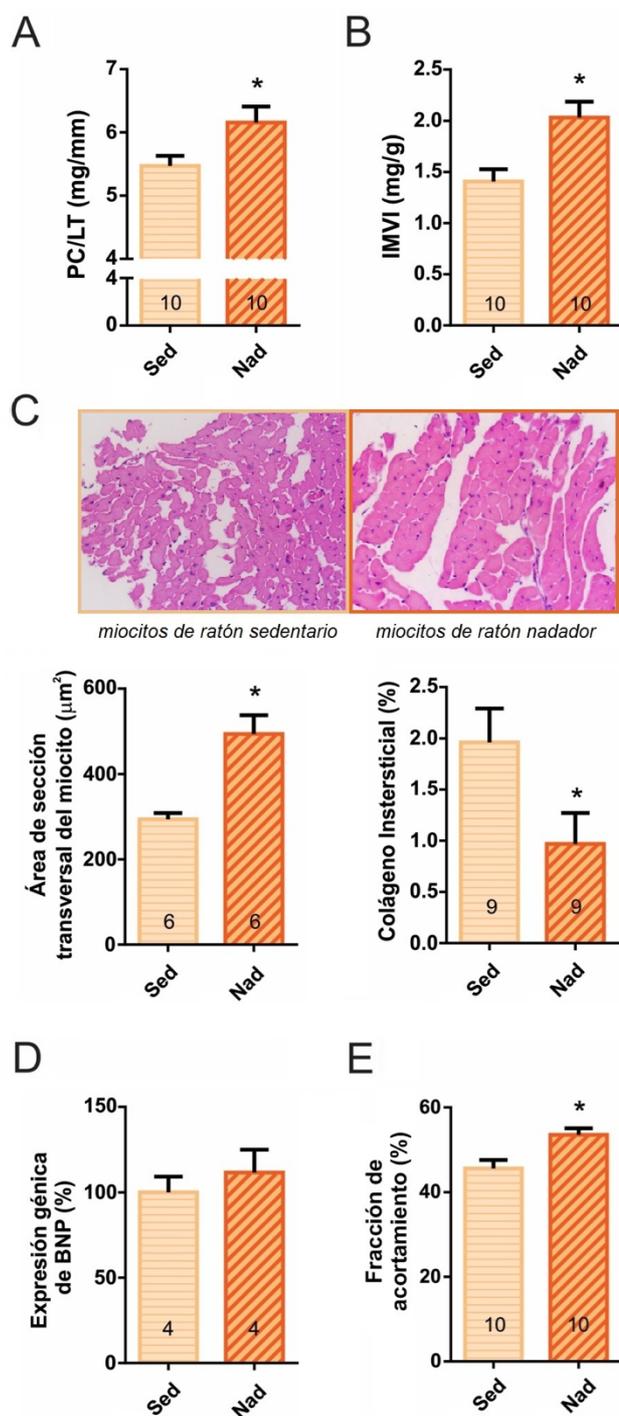


Figura 30. El protocolo de ejercicio induce el desarrollo de HC fisiológica y la adaptación contráctil en ratones WT nadadores. El ejercicio crónico promovió la HC en ratones WT, como lo revela un aumento significativo en la relación entre el peso cardíaco y la longitud de la tibia (PC/LT; **A**), el índice de masa ventricular izquierda (IMVI; **B**). Tal como se puede observar en las imágenes representativas de los cortes histológicos transversales del VI para ambos grupos, el aumento del área de sección transversal de los cardiomiocitos y la ausencia de fibrosis medida como el % de colágeno intersticial, confirmó la naturaleza fisiológica de este aumento de masa cardíaca (**C**), sin cambios en la expresión miocárdica del BNP, un marcador molecular de la HC patológica (**D**). Por su parte, el ejercicio condujo a un incremento de la contractilidad cardíaca evidenciado en el aumento de la fracción de acortamiento, medido por ecocardiografía (al igual que el IMVI) (**E**). El número de corazones *N* evaluados en cada grupo experimental se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$, t-test entre ambos grupos.

Por su parte, en homogenatos de estos corazones se determinó el estado de fosforilación de AKT, CaMKII, del sitio Thr17 de PLN, hallando un incremento significativo en estos parámetros en los corazones de ratones sometidos a ejercicio (figura 31). Sin embargo, la fosforilación de Ser2814 de RyR2 no se modificó en los ratones nadadores (Nad) en comparación con los sedentarios (Sed).

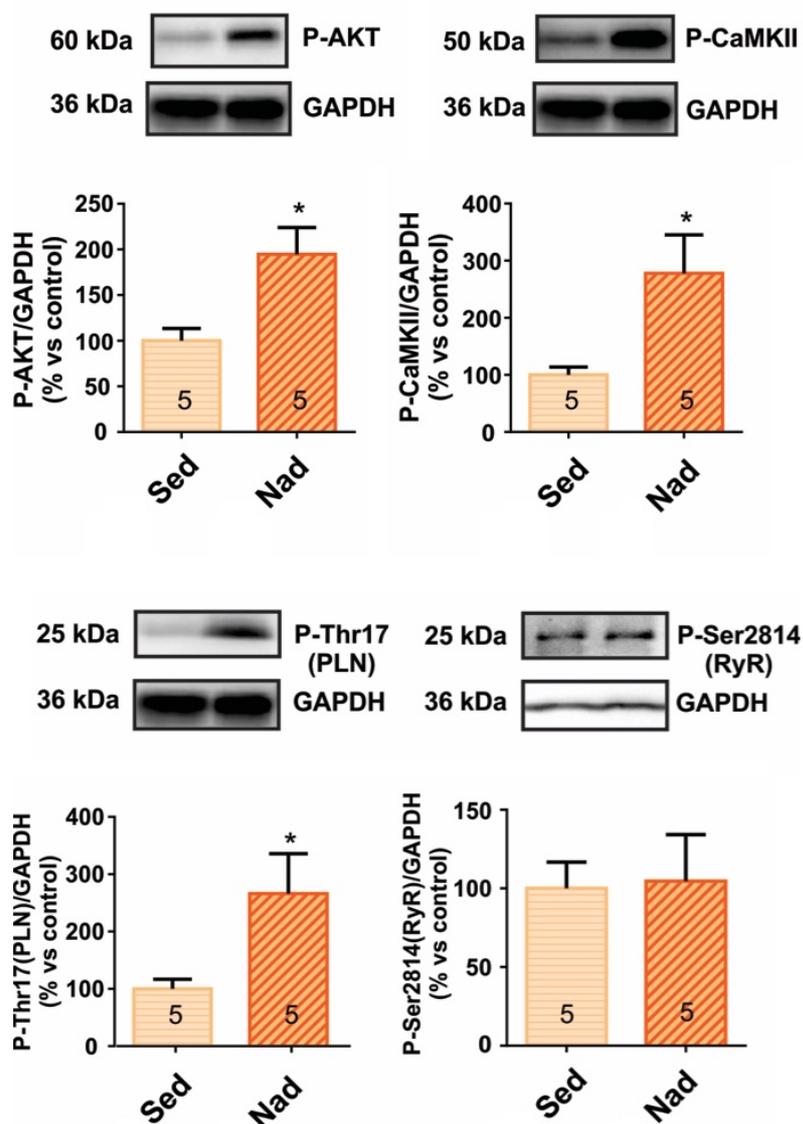


Figura 31. Activación de la vía de señalización mediada por CaMKII e inducida por la rutina de entrenamiento en ratones WT. Western blots representativos y resultados promedios que muestran el efecto del ejercicio en la fosforilación de AKT, CaMKII, Thr17-PLN y Ser2814-RyR2. El número de corazones (N) evaluados en cada grupo se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$, t-test entre ambos grupos.

Tomados en conjunto, los resultados presentados en las figuras 30 y 31 muestran, similar a lo observado en cardiomiocitos aislados tratados en forma aguda con IGF-1 que, un modelo crónico de ejercicio cursa con un aumento de la contractilidad miocárdica y de la activación de la CaMKII (ver figuras 18 y 26).

Para examinar en mayor profundidad la participación de la CaMKII en la HC fisiológica y en la adaptación contráctil asociada al ejercicio, se sometieron a ratones transgénicos AC3-I y AC3-C al mismo protocolo de entrenamiento de natación que los ratones WT. Como se observa en la figura 32, los ratones AC3-C nadadores (Nad) tuvieron un aumento de la masa cardíaca indicada por la medición del PC/LT (A) y en el IMVI (B), con respecto a los sedentarios de la misma cepa (AC3-C Sed). Además, en cortes histológicos del corazón, estos ratones AC3-C ejercitados mostraron mayor área de sección transversal de sus cardiomiocitos (C), sin cambios en la fibrosis intersticial (D), comparado con los sedentarios. Por su parte, los ratones AC3-I mostraron un comportamiento similar en estos parámetros. Estos resultados sugieren entonces que el entrenamiento físico induce el desarrollo de HC fisiológica, sin embargo, la CaMKII no estaría involucrada en este aumento de la masa cardíaca frente al ejercicio sostenido.

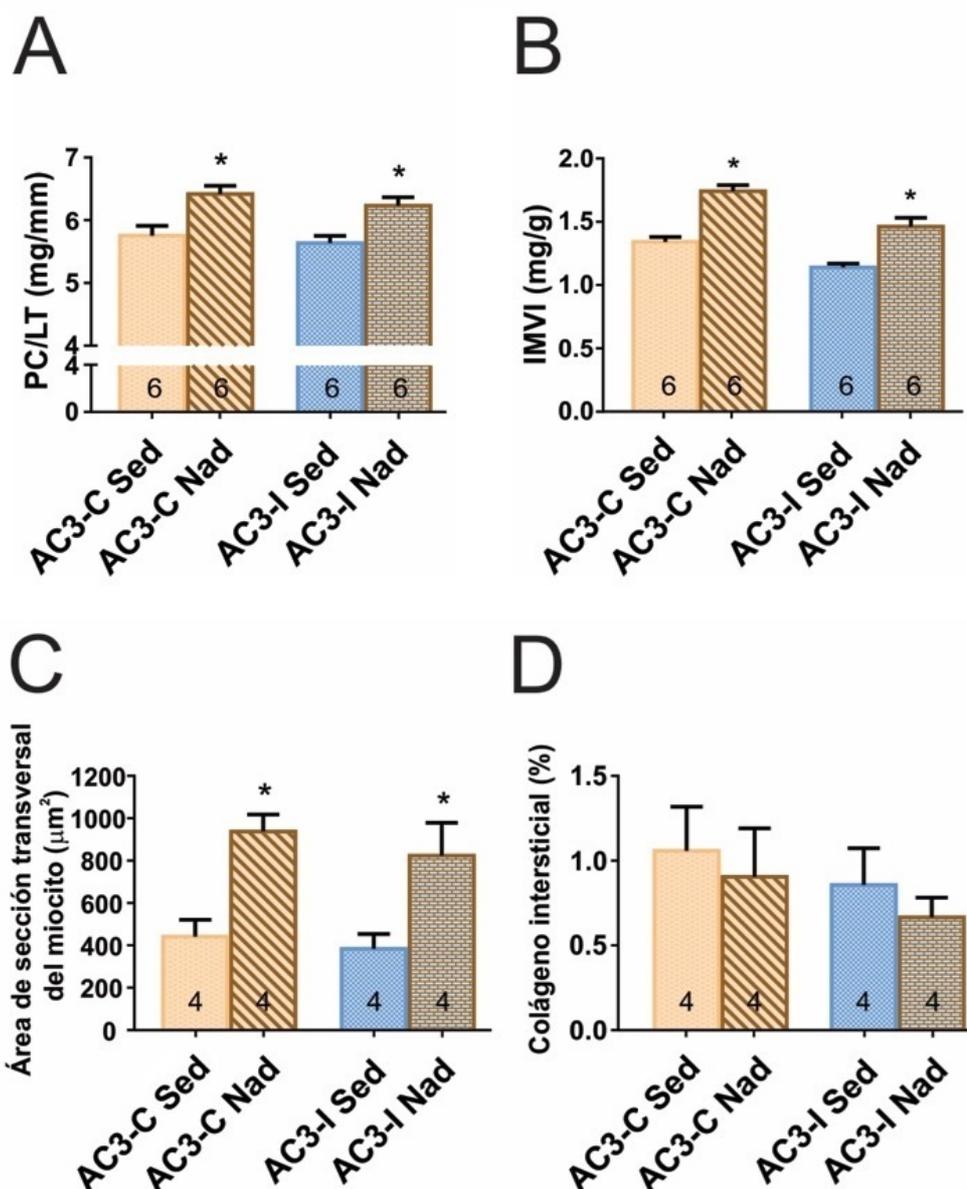


Figura 32. La HC fisiológica inducida por la rutina de natación no depende de la activación de CaMKII. Los ratones transgénicos que expresan un péptido inhibidor de CaMKII (cepa AC3-I) desarrollaron hipertrofia cardíaca fisiológica cuando se sometieron al entrenamiento de natación de manera similar a sus correspondientes controles, ratones AC3-C (que expresan un péptido desordenado de CaMKII), como se indica por el aumento de la relación del peso del corazón sobre la longitud de la tibia (PC/LT; **A**), en el índice de masa ventricular izquierda (IMVI; **B**) y en el área de la sección transversal de los cardiomiocitos (**C**) sin un aumento en el colágeno intersticial (**D**). El número de corazones (N) evaluados en cada grupo se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$ vs los corazones de los ratones sedentarios para cada cepa, prueba t.

Para confirmar la activación de la CaMKII inducida por ejercicio, en homogenatos de corazones de ratones transgénicos AC3-C y AC3-I se evaluó la fosforilación de la quinasa, de sus blancos específicos en Thr17 de PLN y Ser2814 de RyR2, y el sitio específico de PKA en PLN (Ser16). Como se puede observar en la figura 33, en los corazones de los ratones AC3-C nadadores (AC3-C Nad) se muestra un aumento de la actividad de CaMKII, como así también la fosforilación de su sustrato específico a nivel de PLN (Thr17). Sin embargo, no se encontró un incremento en el sitio Ser2814 del RyR2, otro blanco de CaMKII. A su vez, tampoco se encontraron modificaciones en el blanco de PKA (Ser16 de PLN) de estos ratones. En contraste, y como era de esperar, en los corazones de los ratones AC3-I no se observaron aumentos en la actividad de CaMKII ni de la fosforilación de sus blancos en PLN y RyR2 (Thr17 y Ser2814, respectivamente).

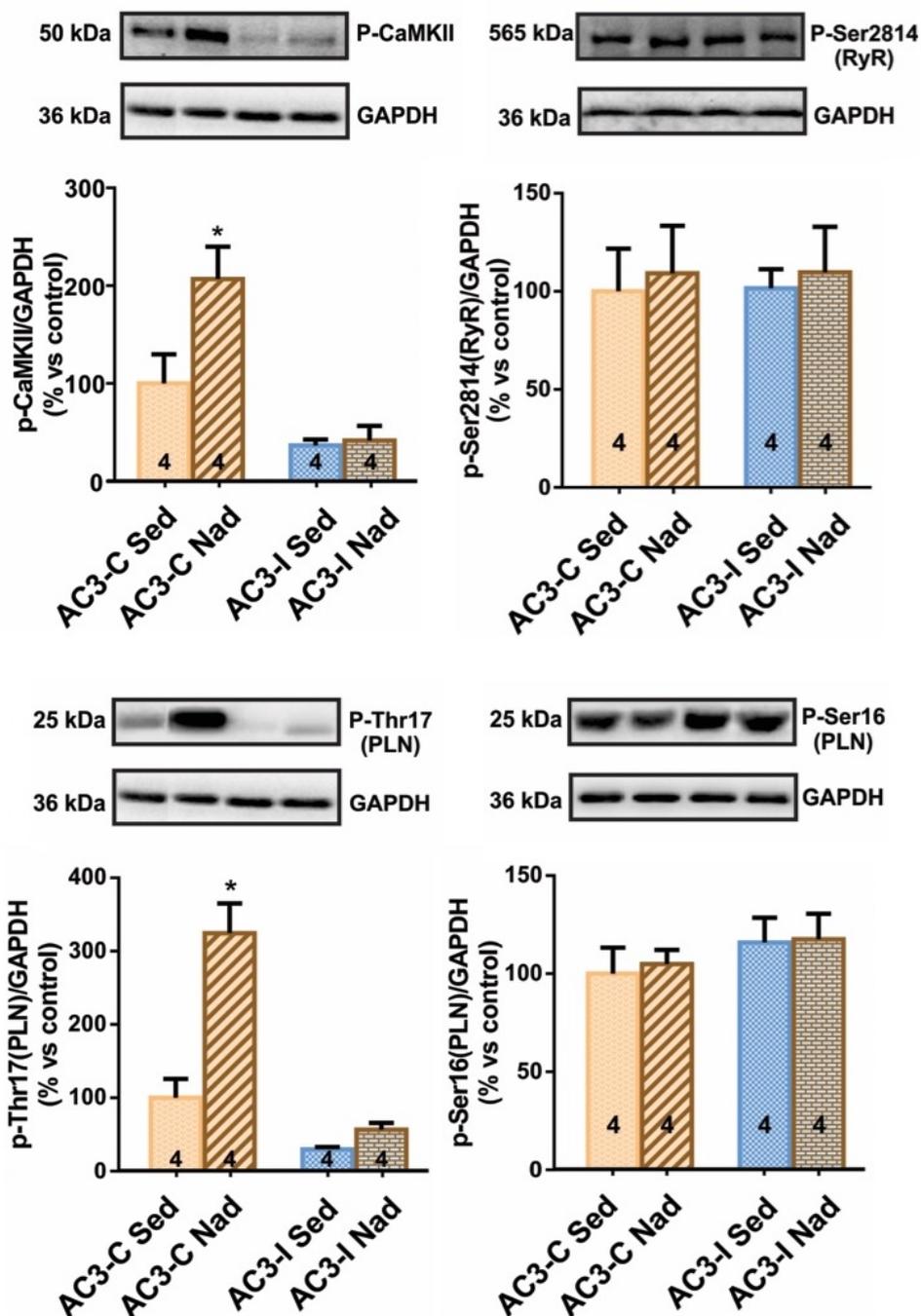


Figura 33. Efecto del ejercicio sobre la actividad de la CaMKII y la de sus blancos específicos en ratones WT y transgénicos. Western blots representativos y resultados promedios que muestran que el ejercicio indujo el aumento en la fosforilación de CaMKII y Thr17-PLN para los ratones transgénicos AC3-C, sin cambios en los AC3-I. La fosforilación en Ser2814 de RyR2 y Ser16 de PLN no se vió alterada con el ejercicio en ambas cepas de ratones transgénicos. El número de corazones (N) evaluados en cada grupo se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$, t-test vs grupos controles.

Posteriormente, como se muestra en la figura 34A por ecocardiografía se detectó un aumento en la fracción de acortamiento en los corazones de ratones AC3-C nadadores (AC3-C Nad) respecto a los controles sedentarios (AC3-C Sed); mientras que

en miocitos aislados de estos ratones AC3-C Nad se encontró un incremento en el acortamiento celular (B) y una disminución en el tiempo a la mitad de la relajación (C), comparado con los ratones AC3-C Sed. Por otro lado, en los ratones AC3-I no se obtuvieron cambios en estos parámetros (Sed vs Nad), apoyando la hipótesis de que la activación de CaMKII sería clave en la respuesta inotrópica y lusitrópica, tal como se observó en los experimentos en miocitos WT perfundidos con IGF-1.

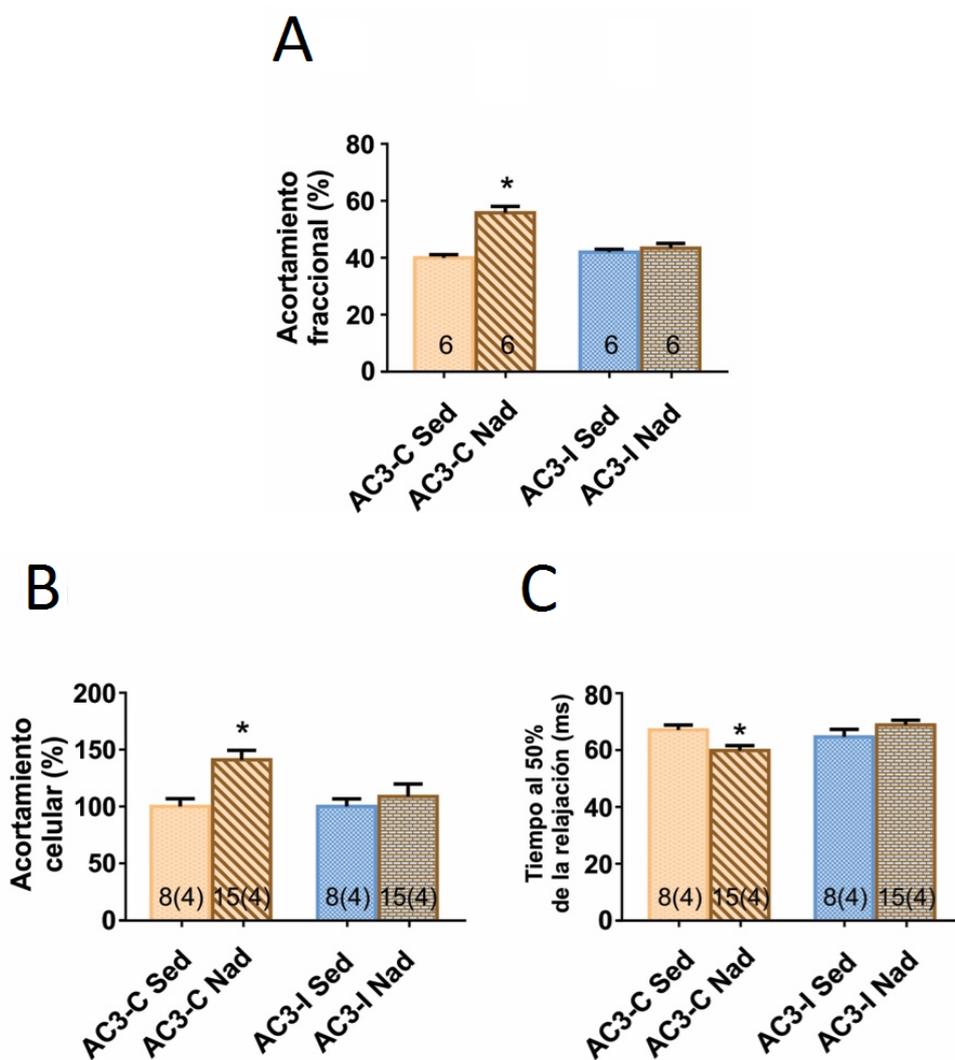


Figura 34. Papel destacado de CaMKII para la adaptación contráctil inducida por el ejercicio. A-B. Resultados promedios del % de acortamiento fraccional y celular que muestran que el ejercicio aumenta la contractilidad cardíaca en los ratones transgénicos AC3-C nadadores (AC3-C Nad), sin cambios en los AC3-I ejercitados (AC3-I Nad). **C.** Además, el protocolo de natación condujo a una aceleración de la relajación, medida como el tiempo al 50% de la relajación ($t_{1/2}$) en los miocitos aislados de ratones AC3-C Nad, sin modificaciones en los AC3-I Nad. El número de células n y de corazones N para cada grupo experimental se representa dentro de las barras. *Indica $p < 0.05$, t-test vs grupos controles.

DISCUSIÓN

El entrenamiento físico es una propuesta consolidada para reducir los factores de riesgo cardiovascular, que en los últimos años, ha surgido como una estrategia prometedora tanto para el tratamiento de pacientes con enfermedades cardiovasculares, como para mejorar su calidad de vida (Kokkinos P y Myers J 2010; Manson JE y col. 2002; Wisløff U y col. 2007). Varios estudios en modelos experimentales han demostrado su capacidad no sólo para revertir el remodelado cardíaco patológico, sino también para recuperar el manejo de Ca^{2+} anormal y mejorar la contractilidad (Garciaarena CD y col. 2009; Gielen S y col. 2010). Además, Hambrecht y col. publicaron el primer estudio que proporciona evidencia de una mejora en la fracción de eyección y una reducción del diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo (DDVI) en pacientes con miocardiopatía isquémica dilatada luego de un período de entrenamiento físico (Hambrecht R y col. 2000). Más tarde, estos hallazgos fueron corroborados en pacientes con IC crónica estable, en los que el entrenamiento físico sostenido atenuó el remodelado anormal del miocardio (Giannuzzi P y col. 2003).

Los aspectos beneficiosos del ejercicio para la salud y el corazón en particular, son ampliamente reconocidos. Por lo tanto, es importante identificar los mecanismos moleculares por los cuales el corazón se adapta al ejercicio regular, que aún no han sido dilucidados completamente. Al comprender los mecanismos naturales e innatos por los cuales el corazón normal es remodelado con el ejercicio físico, se podría obtener el conocimiento necesario para diseñar estrategias terapéuticas que permitan sanar un corazón enfermo. Además, se deben buscar alternativas al ejercicio para tratar a aquellos pacientes con problemas cardíacos que no quieran o no puedan hacer ejercicio regularmente. Esto podría lograrse mediante enfoques farmacológicos que apunten a gatillar las vías de señalización beneficiosas activadas por el entrenamiento físico, con el objetivo de alcanzar un nuevo paradigma denominado “ejercicio en una píldora” (Goodyear LJ 2008; Richter EA y col. 2008).

La adaptación cardíaca al ejercicio aeróbico crónico conduce, entre los eventos principales, al desarrollo de HC fisiológica y a una mejora de la función contráctil. Los antecedentes señalan que la liberación de IGF-1 con la consecuente activación de la vía PI3K/AKT son sucesos críticos en la génesis de la HC fisiológica (Catalucci D y col. 2008; Kim SJ y col. 2008, Ellison GM y col. 2012).

El papel clave desempeñado por el IGF-1 en la respuesta hipertrófica inducida por el ejercicio físico, ha sido ampliamente demostrado en diferentes modelos experimentales por varios grupos de investigación. En este contexto, los ratones transgénicos KO-específicos para el IGF-1R (IGF-1R-KO) no desarrollan HC en respuesta a 5 semanas de entrenamiento de natación, como sí lo hacen sus controles WT (Kim J y col. 2008). Por otra parte, la inhibición o delección genética de PI3K o AKT previene la HC fisiológica, apoyando un papel clave para esta vía de señalización en la estimulación del crecimiento cardíaco en respuesta al ejercicio físico (De Bosch B y col. 2006; McMullen JR y col. 2003; McMullen JR y col. 2004; O'Neill BT y col. 2007). En contraste, el papel del IGF-1 en la mejora contráctil vinculado con el ejercicio ha sido poco estudiado.

1. El IGF-1 produce un EIP y ELP por un mecanismo dependiente de NO y CaMKII en cardiomiocitos ventriculares aislados de ratón

Para comenzar a dilucidar los mecanismos subyacentes a la mejora de la función cardíaca contráctil asociada al ejercicio, se estudió el efecto del IGF-1 sobre la contractilidad en miocitos aislados de ratón.

Es importante destacar que, a la fecha, no son uniformes las evidencias respecto a las consecuencias inotrópicas del IGF-1 en el miocardio (Kinugawa S y col. 1999; Ren J y col. 1998; Ren J y col. 1999; von Lewinski D y col. 2003; Li Q y col. 2007). Sin embargo la mayoría de los autores propone que este agente pro-hipertrófico promueve un aumento en la contractilidad cardíaca vinculado a la activación de la vía AKT (Freestone NS y col. 1996; Kim SJ y col. 2008; Ellison GM y col. 2012). La discordancia principal entre estos estudios radica en el mecanismo de transducción de señales por el cual el IGF-1 causa sus efectos inotrópicos en el músculo cardíaco. Un trabajo realizado en cardiomiocitos insuficientes de humanos, indica que el IGF-1 induce un EIP mediado por un incremento del Ca^{2+}_i . Este resulta como consecuencia de una mayor amplitud de la ICa_L y del funcionamiento en modo reverso (introduciendo Ca^{2+}) del NCX secundario a la sobrecarga de Na^+ ; determinada por la hiperactividad del NHE-1 (von Lewinski D y col. 2003). Por su parte, Li y col. proponen que la sobreexpresión crónica de IGF-1 en el corazón contribuye a mejorar la función contráctil al aumentar la retoma de Ca^{2+} por el RS por una mayor expresión/actividad de la SERCA2a (Li Q y col. 2007). El grupo de Ren y col. demuestra en músculos papilares de ratas normotensas, que el IGF-1 promueve un EIP dependiente de la edad mientras que no tiene ningún efecto inotrópico en un modelo de ratas hipertensas (Ren J y col. 1999). Estos estudios previos indican la necesidad de continuar explorando el efecto del IGF-1 sobre la contractilidad cardíaca a fin de dilucidar el/los mecanismo/s de acción que conducen a la respuesta contráctil.

Los resultados presentados en la figura 18 de este trabajo de tesis, aportan claridad respecto a este punto. En primer lugar, demuestran que el IGF-1 administrado en forma aguda en cardiomiocitos aislados de ratón conduce a un EIP y ELP, evidenciado por el aumento de la amplitud del acortamiento celular y de la aceleración de la relajación, respectivamente. Además, mediante el agregado de un antagonista específico del IGF-1R (AG-1024), es posible cancelar el aumento de la respuesta inotrópica y lusitrópica, demostrando la especificidad del efecto.

Con respecto a los componentes subcelulares involucrados en el EIP/ELP del IGF-1 se realizaron experimentos utilizando inhibidores farmacológicos específicos para distintas moléculas implicadas en el manejo del Ca^{2+}_i .

Como ya fuera mencionado, la CaMKII juega un papel fisiológico clave en el AEC a través del ajuste fino de la maquinaria contráctil. Regula, mediante fosforilación, la actividad de diversas proteínas que incluyen los LTCC, PLN, RyR2 y la SERCA2a involucradas en el ciclado de Ca^{2+} . En general, la fosforilación de estos sustratos aumenta la cinética y la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i (Maier LS y col. 2007). Así

también, la CaMKII ha sido propuesta como moduladora del EIP y ELP que se generan por incrementos en el Ca^{2+}_i al aumentar la frecuencia de estimulación (Valverde C y col. 2005; De Santiago J y col. 2002). En este sentido, existen evidencias previas que sugieren que el IGF-1 también puede inducir la activación de CaMKII (Carrasco L y col. 2014). Además, varios estudios proponen que la activación de CaMKII sería necesaria para la mejora de la contractilidad cardíaca inducida por el ejercicio físico (Kemi OJ y col. 2007; Kemi OJ y col. 2008; Stølen TO y col. 2009; Kaurstad G y col. 2012).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que la activación de CaMKII inducida por el tratamiento agudo con IGF-1 sería esencial para la mejora de la función contráctil, ya que la inhibición farmacológica (KN-93, figura 18) y genética (ratones transgénicos AC3-I, figura 28) específica de esta quinasa previene el EIP y ELP en el modelo *in vitro* de cardiomiocitos ventriculares aislados. En ambos casos, ya sea en presencia de KN-93 o en miocitos de ratones transgénicos AC3-I, se evita el aumento de la amplitud del acortamiento celular y de la velocidad de relajación inducidos por IGF-1.

Por otro lado, está ampliamente descrito que el NO es un regulador de la contractilidad cardíaca. Muchos trabajos han demostrado el papel dual del NO en la respuesta contráctil de manera dependiente de su concentración, conduciendo a un aumento del inotropismo a bajos niveles, y a una disminución de la contractilidad a altas concentraciones (Vila Petroff MG y col. 1999; Kojda G y col. 1996). Existen evidencias que vinculan al NO con el EIP inducido por IGF-1. Ren y col. describen que el IGF-1, a través de las alteraciones en los niveles de NO intracelular, promueve un EIP en músculos papilares y en miocitos aislados de ratas diabéticas (Ren J y col. 1998). En este contexto es importante recordar que las NOS, enzimas responsables de la producción de NO, son sustratos reconocidos de la AKT que al fosforilarlas las activa (Kawasaki K y col. 2003; Haynes MP y col. 2000; Curran J y col. 2014). A su vez, la AKT forma parte de la vía canónica de señalización disparada por el IGF-1. Actualmente se conoce que un mecanismo que subyace a los efectos cardioprotectores del ejercicio físico está asociado con la producción de NO mediada principalmente por la isoforma nNOS (Roof SR y col. 2013; Wang B y col. 2017) que se localiza preferentemente en RS (Xu KY y col. 1999; Barouch LA y col. 2002). Diferentes trabajos señalan que la nNOS puede modular el AEC, ya sea regulando la actividad de los LTCC, de PLN o del RyR2 (Danson EJ y col. 2005; Wang H y col. 2008; Stoyanovsky D y col. 1997). Está descrito que la señalización de nNOS contribuye a una contracción mejorada y una relajación acelerada a través del aumento en el ciclado de Ca^{2+} en el RS (Barouch LA y col. 2002; Khan SA y col. 2003; Wang H y col. 2010). Respecto a la actividad de eNOS en el cardiomiocito, se ha reportado recientemente que no es favorecida por el ejercicio, y por lo tanto, no contribuiría a la cardioprotección en este tipo de respuesta adaptativa o fisiológica (Farah C y col. 2016).

En función de los antecedentes descritos, se evaluó en el modelo *in vitro* la participación del NO en la respuesta contráctil a IGF-1. Los resultados obtenidos y presentados en la figura 18 de esta tesis, usando un inhibidor no selectivo de las NOS

(L-NAME), demuestran el papel protagónico del NO en el EIP y el ELP del IGF-1. Una vez corroborado el rol causal del NO en el efecto contráctil, se examinó cual/cuales eran las isoformas de las NOS involucradas. La producción de NO sería consecuencia de la activación específica de la isoforma nNOS ya que en presencia de un inhibidor farmacológico selectivo para la misma (NG) se cancelaron los efectos de IGF-1 sobre la contractilidad. Un sustento adicional para este resultado es la localización de la isoforma nNOS preferentemente en RS. Dado que los resultados fueron obtenidos luego de tiempos breves de estimulación con IGF-1 la contribución de la isoforma iNOS se considera sumamente improbable.

Por otra parte, un estudio de Kim y col. describe que el tratamiento crónico con IGF-1 aumenta la respuesta contráctil y relajante mediada por un incremento en la actividad de SERCA2a dependiente de AKT en cardiomiocitos aislados de rata (Kim SJ y col. 2008). La activación y participación de la AKT en la respuesta inotrópica y lusitrópica al IGF-1 también se corrobora en esta tesis en los experimentos realizados en presencia del inhibidor específico de esta quinasa (MK-2206). Una vez más, y como se muestra en la figura 18, el EIP y el ELP inducido por IGF-1 no se evidencia en presencia de MK-2206.

De esta manera, los resultados obtenidos en cuanto al efecto agudo del IGF-1 sobre la contractilidad de los cardiomiocitos, sugieren que estaría mediado por la AKT a través de un mecanismo dependiente tanto de la producción intracelular de NO como de la actividad de CaMKII.

2. El IGF-1 estimula la producción de óxido nítrico por nNOS de manera independiente de CaMKII

El IGF-1 estimula la síntesis de NO en diversos tejidos o tipos de células (Vetter U y col. 1988; Stromer H y col. 1996; Muniyappa R y col. 1997). Existen numerosas evidencias indican que el ejercicio aeróbico, además de aumentar los niveles plasmáticos y cardíacos de IGF-1 y activar la vía PI3K/AKT (De Bosch B y col. 2006; McMullen JR y col. 2003; McMullen JR y col. 2004; O'Neill BT y col. 2007), cursa con un aumento de la expresión de la nNOS, y consecuentemente, de la síntesis de NO (Roof SR y col. 2013; Wang B y col. 2017).

Sin embargo, si el IGF-1 administrado en forma aguda aumenta la producción intracelular de NO en cardiomiocitos aislados de ratón adulto aún no había sido estudiado. Sólo existe un trabajo publicado por Esberg y col. que compara los niveles de NO, la expresión de eNOS y la actividad de las NOS inducida por IGF-1 en cardiomiocitos ventriculares aislados de ratas de ambos sexos (Esberg LB y col. 2004).

En base a estos estudios previos, se exploró si el IGF-1 administrado en forma aguda es capaz de aumentar la producción intracelular de NO en cardiomiocitos aislados de ratón. Además, como ya fue demostrada la participación de la isoforma nNOS en los hallazgos sobre la contractilidad cardíaca se corroboró su contribución en la síntesis de NO.

En este trabajo de tesis se demuestra que la perfusión de cardiomiocitos aislados de ratón adulto con IGF-1 promueve la producción citosólica de NO (figura 22). Este efecto se cancela tanto con el inhibidor específico del IGF-1R (AG-1024) y de AKT (MK-2206), como con el uso de bloqueantes de la síntesis de NO, mediante un inhibidor no selectivo para las NOS (L-NAME) y uno específico para la isoforma de la nNOS (NG). Sin embargo, no se previene inhibiendo de manera específica a la CaMKII con KN-93, lo que sugeriría que la activación de esta quinasa ocurriría corriente abajo de la producción de NO.

En conjunto, los resultados obtenidos fueron los primeros en describir en cardiomiocitos que la administración aguda de IGF-1 conduce a un aumento en la liberación del NO citosólico sintetizado por la nNOS activada por AKT.

3. Vía de señalización intracelular inducida por IGF-1 en corazones perfundidos de ratón

Los resultados discutidos en el párrafo anterior permitieron especular que el NO resultante de la activación de la nNOS sería el responsable de la activación de la CaMKII y consecuentemente de la mejora contráctil inducida por IGF-1. En este sentido son interesantes los resultados de Jian y col. que sustentan que la nNOS y la CaMKII están espacialmente acopladas en el RS, con un efecto facilitador sobre la contractilidad (Jian Z y col. 2014). Mas aún, en estudios realizados en cardiomiocitos aislados, el aumento de NO sintetizado por nNOS de manera dependiente de AKT, fue propuesto como responsable de la activación de CaMKII (Curran J y col. 2014; Gutierrez DA y col. 2013; Pereira L y col. 2017). Además, otro estudio sugiere que la activación de CaMKII es mediada por la nitrosilación de residuos dentro del dominio regulador de la quinasa (Erickson JR y col. 2015). En el caso del entrenamiento aeróbico, el aumento de la biodisponibilidad de NO podría ser el resultado no sólo de una fosforilación de nNOS dependiente de AKT (resultados presentados en esta tesis), sino también de una mayor expresión de la enzima (Roof SR y col. 2013).

A fin de dilucidar la cascada de señalización intracelular gatillada por IGF-1, se perfundieron corazones de ratones (modelo *ex vivo*) en presencia de este factor de crecimiento con el agregado de distintos inhibidores farmacológicos, en particular para la nNOS (con NG) y la CaMKII (con KN-93), para estudiar fundamentalmente el eje NO/CaMKII. Como se muestra en la figura 24 y 25, el tratamiento agudo con IGF-1 aumenta la actividad de AKT y de nNOS, sin cambios en la abundancia de ARNm ni en la proteína de nNOS, sugiriendo que el incremento de NO se debe a un aumento en la actividad de la enzima y no en su expresión. Además, los corazones perfundidos con IGF-1 mostraron un aumento en la fosforilación de CaMKII y de su blanco específico (Thr17) en la PLN (figura 26). De manera interesante, la actividad de CaMKII en respuesta a IGF-1 se ve reducida en presencia del inhibidor específico de nNOS (NG). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en la figura 22, que muestran que el aumento en la producción de NO no se previene al inhibir farmacológicamente a la

CaMKII, indicando que la síntesis de NO y la activación de CaMKII corresponderían a la misma cascada de señalización disparada por IGF-1, en la cual CaMKII se activa corriente abajo al incremento intracelular de NO. Estos datos además sugieren que el IGF-1 activa a la CaMKII de una manera dependiente de nNOS, estando también sustentados por estudio reciente de Erickson y col. que describe que la S-NO del sitio Cys290 por un donante de NO (GSNO) resulta en el incremento sostenido de la actividad de CaMKII (Erickson JR y col. 2015). Además, como se indica en la figura 27, en experimentos realizados en homogenatos de corazones perfundidos con un donante de NO (SNAP), se demostró la activación directa de la CaMKII mediada por S-NO. Por su parte, como se muestra en la figura 26, el sitio Ser2814 del RyR2, otro blanco conocido de CaMKII, no evidenció cambios en su fosforilación con el tratamiento de IGF-1, con lo cual el RyR2 no contribuiría al desarrollo del EIP disparado por IGF-1. Asimismo, en presencia de IGF-1 no se encontraron diferencias en la fosforilación de Ser16 de PLN, un blanco específico de PKA, lo que permitió descartar la posibilidad de que la actividad de esta quinasa esté contribuyendo en esta cascada de señalización que deriva en la mejora de la función contráctil.

Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que la mejoría de la función contráctil causada por el tratamiento con IGF-1 está mediada por la vía de señalización secuencial de AKT/nNOS/NO/CaMKII; indicando que la actividad de CaMKII sería modulada por la producción intracelular de NO.

4. El IGF-1 aumenta el contenido de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático y la amplitud y velocidad de relajación del transitorio de Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados de ratón

Con el fin de estudiar el mecanismo subyacente por el cual el IGF-1, a través de la activación de CaMKII aumenta la contractilidad cardíaca, exploramos los posibles blancos de la quinasa en el ciclado de Ca^{2+} .

Como fue mencionado anteriormente, la PLN, un regulador constitutivo de la función de la SERCA2a, es un sustrato bien conocido para CaMKII (Lindemann JP y col. 1985; Mundiña-Weilenmann C y col. 1996; Vittone L y col. 2008). Una vez activada CaMKII en el microdominio del RS, en este caso por el aumento NO dependiente de nNOS, fosforilaría el residuo Thr17 de PLN permitiendo una mayor actividad de SERCA2a, y por lo tanto, mejorando el manejo de Ca^{2+} y la contractilidad. En este sentido, un estudio realizado por Kim y col. muestra que el tratamiento con IGF-1 condujo a una mejora en la respuesta contráctil dado por un aumento de la actividad de SERCA2a (Kim SJ y col. 2008). Además, en corazones de los ratones crónicamente ejercitados se ha evidenciado un aumento significativo de la expresión de la SERCA2a, que posiblemente contribuya al EIP y ELP asociado al ejercicio (Li Q y col. 2007; Kemi OJ y col. 2008).

Los resultados presentados en la figura 29 muestran que la función contráctil mejorada en respuesta al IGF-1 se asocia a un aumento significativo de la amplitud y la

velocidad de relajación del transitorio, y del contenido de Ca^{2+} del RS. Además, estos efectos pudieron prevenirse con el agregado de inhibidores específicos tanto para IGF-1R, nNOS y CaMKII. A su vez, estos datos están de acuerdo con los estudios de Kemi y col. que describieron un aumento en la fosforilación de CaMKII y de Thr17-PLN junto con una mejoría de la contractilidad miocárdica en ratones sometidos a un protocolo de entrenamiento aeróbico durante 6 semanas (Kemi OJ y col. 2007). Si bien, los estudios realizados por el grupo de Roof y col. también apoyan la activación de CaMKII dependiente de nNOS durante el entrenamiento físico, estos autores le atribuyeron la mejora en el manejo de Ca^{2+} en los cardiomiocitos, a un aumento en la fosforilación de Ser16 de PLN sin cambios detectables en la fosforilación de Thr17 de PLN. De hecho, este estudio descarta un aumento en la actividad de PKA, la quinasa responsable de la fosforilación de Ser16 de PLN, y propone una inhibición de las fosfatasa dependiente de CaMKII como mecanismo subyacente del EIP (Roof SR y col. 2013; Roof SR y col. 2015). Sin embargo, como mencionamos anteriormente, en el presente trabajo de tesis no se detectaron aumentos en la fosforilación de Ser16 (figura 26), sugiriendo que PKA no estaría involucrada en la respuesta contráctil generada por IGF-1.

PLN no es el único blanco de CaMKII que puede estar involucrado en el EIP de IGF-1. Un aumento en la corriente de Ca^{2+} de tipo L ($I\text{Ca}_L$) a través de la fosforilación del LTCC dependiente de CaMKII, también puede aumentar los transitorios de Ca^{2+} y la contractilidad. Con respecto a este mecanismo, Sun y col. demostraron que el IGF-1 mejora la $I\text{Ca}_L$ a través de un mecanismo dependiente de PI3K/AKT (Sun J y col. 2006). Además, en el contexto del entrenamiento crónico, recientemente se propuso que AKT controla directamente la densidad proteica del canal de Ca^{2+} de tipo L y la $I\text{Ca}_L$ al evitar la degradación de la subunidad formadora de poros del complejo de LTCC (Catalucci D y col. 2009). Si bien nosotros no estudiamos específicamente el papel de los LTCC, nuestros resultados muestran que la inhibición farmacológica o genética de CaMKII puede suprimir por completo el EIP y ELP inducido por IGF-1, sugiriendo que si la $I\text{Ca}_L$ contribuye al efecto contráctil estimulado por IGF-1 agudo es a través de un mecanismo dependiente de CaMKII.

Otros autores proponen a la mejora en la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} como una adaptación cardíaca importante al entrenamiento físico aeróbico (Kemi OJ y col. 2005, Wisløff U y col. 2001, Kemi OJ y col. 2004, Diffee GM 2004). El grupo de Kemi y col. describe que la inhibición de CaMKII en cardiomiocitos de ratones entrenados causa que la sensibilidad al Ca^{2+} se revierta hacia niveles cercanos a los controles sedentarios; por lo tanto, sugiere que la CaMKII mejora la sensibilidad del Ca^{2+} inducida por el ejercicio regular. Un mecanismo propuesto para mejorar la sensibilidad al Ca^{2+} ha sido que las troponinas T (TnT) (Anderson PA y col. 1995) y TnI (Layland J y col. 2005) experimentan un cambio en la expresión cardíaca de sus isoformas y se gatilla particularmente un aumento en la expresión génica y proteica de la cadena liviana de miosina de tipo I (MLC-1), que se asocia a un incremento en la

velocidad de acortamiento celular (Difee GM 2004). Si bien se desconoce el/los mecanismo/s que median los efectos del aumento en la expresión de MLC-1 para regular la contractilidad miocárdica, se ha demostrado que la región N-terminal de esta proteína interactúa con el miofilamento de actina durante la formación de puentes cruzados, de manera que afecta la capacidad de unión de miosina-actina (Morano I y col. 1997). A pesar de que no fue evaluado en el presente trabajo de tesis, es posible que un aumento en la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} dependiente de CaMKII también contribuya al EIP inducido por IGF-1.

En conjunto, los resultados sugieren que el tratamiento agudo con IGF-1 conduce a un aumento en la fosforilación de AKT y la consecuente activación de la nNOS, con una mayor producción de NO. En tanto, la activación de la CaMKII por NO, resultaría en un aumento en el ciclado de Ca^{2+} por el RS, mediado por la fosforilación del residuo Thr17 de PLN y un aumento en la actividad de SERCA2a. Por lo tanto, se induciría un aumento en la velocidad de relajación o ELP y se incrementaría el contenido de Ca^{2+} del RS conduciendo en un aumento de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} y al EIP.

Resulta interesante que ha sido demostrado que la vía NOS-CaMKII, descrita en la presente tesis, contribuye no solo al EIP sino también al potencial arritmogénico de la estimulación β -AR. Esta última parece ser la consecuencia de la fosforilación de RyR2 por CaMKII que favorece la pérdida de Ca^{2+} del RS y las ondas espontáneas de Ca^{2+} arritmogénicas (Curran J y col. 2014; Gutierrez DA y col. 2013; Bers DM y Morotti S 2014). Dado que la adaptación cardíaca fisiológica al ejercicio de intensidad moderada no implica una mayor susceptibilidad a las arritmias (Yang KC y col. 2010; Halle M y col. 1999; Eijsvolgel TM y col. 2016; Rolim N y col. 2015; Biffi A y col. 2008) y que no se detectó un aumento en la fosforilación de Ser2814 de RyR2 en corazones estimulados con IGF-1 o en ratones entrenados, especulamos que las consecuencias beneficiosas o perjudiciales en el manejo de Ca^{2+} podrían depender de la compartimentalización temporo-espacial de la activación dependiente de NO de CaMKII. Por lo tanto, bajo condiciones fisiológicas, es decir en situaciones de ejercicio, la nitrosilación de CaMKII mejoraría la actividad de SERCA2a a través de la fosforilación de Thr17 de PLN. Sin embargo, en circunstancias patológicas como en sobrecarga de presión, CaMKII también fosforilaría a los RyR2 induciendo la pérdida de Ca^{2+} del RS y proporcionando un sustrato arritmogénico.

5. El papel de CaMKII en la adaptación cardíaca al ejercicio físico aeróbico en ratones sometidos a una rutina de natación

En la actualidad, no existen evidencias de que la CaMKII participe en el desarrollo de la HC fisiológica. Aún así, se sabe que el ejercicio aeróbico lleva a un aumento en la actividad de CaMKII (Kemi OJ y col. 2007; Kemi OJ y col. 2008; Kaurstad G y col. 2012). Por el contrario, varios estudios sugieren que la CaMKII juega un papel

clave en la fisiopatología de la HC patológica (Zhang T y Brown JH 2004; Mishra S y col. 2010; Zhang M y col. 2015).

Por lo expuesto, se exploró el rol de CaMKII en el desarrollo de la HC fisiológica inducida por un protocolo de natación en ratones WT y en transgénicos con CaMKII inhibida (AC3-I). En primer lugar, se caracterizó el modelo de ejercicio físico en ratones WT demostrando que la rutina de entrenamiento condujo al desarrollo de HC (figura 30) evidenciado en el aumento de masa cardíaca según determinaciones histológicas (área transversal de los cardiomiocitos y % colágeno intersticial), ecocardiografía (IMVI) y pesaje del corazón normalizado por la longitud de la tibia del ratón (PC/LT). Además, se corroboró que este modelo *in vivo* condujo al desarrollo de HC de tipo fisiológica ya que no se observó un aumento de la abundancia del colágeno intersticial ni tampoco en los niveles de BNP, un marcador molecular de HC patológica.

La rutina de entrenamiento físico en ratones WT además, gatilló la activación de la cascada de señalización de AKT, CaMKII y PLN, de manera similar a lo demostrado por el tratamiento con IGF-1. Sin embargo, tanto los ratones transgénicos AC3-C y AC3-I desarrollaron HC fisiológica de similar magnitud, sugiriendo que la CaMKII no estaría involucrada en las vías de señalización que conducen al aumento de la masa miocárdica en respuesta al entrenamiento (figura-32).

Por otra parte, los resultados expuestos en la figura 34 que muestran que el entrenamiento condujo a un mayor acortamiento celular (medido en el modelo *in vivo* e *in vitro*) y una relajación más rápida en ratones AC3-C pero no en los ratones AC3-I, apoyan la hipótesis de que el EIP y ELP inducidos por el ejercicio crónico se deberían a una mayor retoma de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico (RS). Ésta a su vez, sería la consecuencia del aumento en la actividad de SERCA2a favorecido por la fosforilación del residuo de Thr17 de PLN por la CaMKII.

El hecho de que la activación de CaMKII fuera esencial para la respuesta contráctil inducida por IGF-1 en miocitos aislados, como se demostró por la ausencia del EIP/ELP no sólo en presencia del inhibidor específico de CaMKII, KN-93 (figura 18), sino también en ratones transgénicos AC3-I que sobreexpresan un péptido inhibidor específico en el miocardio (figura 27); sumado al desarrollo normal de la HC fisiológica inducido por la rutina de natación en los ratones AC3-I (figura 31), reveló un punto clave de divergencia en la vía de señalización que conduce a la HC y a la adaptación contráctil al ejercicio. Los resultados presentados en esta tesis, describen por primera vez que la activación de CaMKII, a pesar de ser crítica para la respuesta inotrópica y lusitrópica, no sería necesaria para el aumento de la masa cardíaca en respuesta al estímulo hipertrófico fisiológico disparado por el ejercicio crónico.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo de tesis proponen que el ejercicio crónico, a través de la liberación de IGF-1, induce la fosforilación de AKT que a su vez activa la nNOS y aumenta la producción de NO en el miocardio. El

aumento del NO sería responsable de la activación de CaMKII, que resultaría en un mejor manejo de Ca^{2+} del RS y, por tanto, de la contractilidad cardíaca. El mecanismo subyacente implicaría la fosforilación de Thr17 de PLN incrementando la actividad de SERCA2a, que por un lado sería responsable del aumento en la velocidad de relajación o ELP, pero que por otro lado, incrementaría la carga de Ca^{2+} del RS resultando en un aumento de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} , y por ende, de la contractilidad (EIP).

Además estos resultados sugieren la presencia de vías de señalización distintas para la respuesta contráctil y para el aumento de masa cardíaca, estando CaMKII específicamente involucrada en el EIP y ELP asociado con el entrenamiento físico regular.

CONCLUSIONES

En función del análisis de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral, es posible formular las siguientes conclusiones:

1. El IGF-1 estimula la producción de NO mediada por nNOS en corazones y cardiomiocitos aislados de ratón.
2. El IGF-1 activa a la CaMKII en corazones y cardiomiocitos aislados de ratón.
3. La activación de CaMKII inducida por IGF-1 ocurre de manera dependiente de la nNOS.
4. La administración aguda de IGF-1 produce un efecto inotrópico y lusitrópico positivo que depende de NO y de la activación de CaMKII en cardiomiocitos aislados de ratón.
5. La CaMKII, a través de la fosforilación del residuo Thr17 de PLN sería responsable del aumento del contenido de Ca^{2+} del RS, la amplitud del transitorio de Ca^{2+} y la contractilidad.
6. La rutina de entrenamiento empleada (natación durante 6 semanas) induce el desarrollo de HC fisiológica y una mejora de la función contráctil en ratones.
7. CaMKII juega un papel esencial en la respuesta adaptativa contráctil pero no en el aumento de la masa cardíaca asociada al entrenamiento aeróbico.

A continuación, en la figura 35 se resume esquemáticamente la secuencia de eventos propuestos.

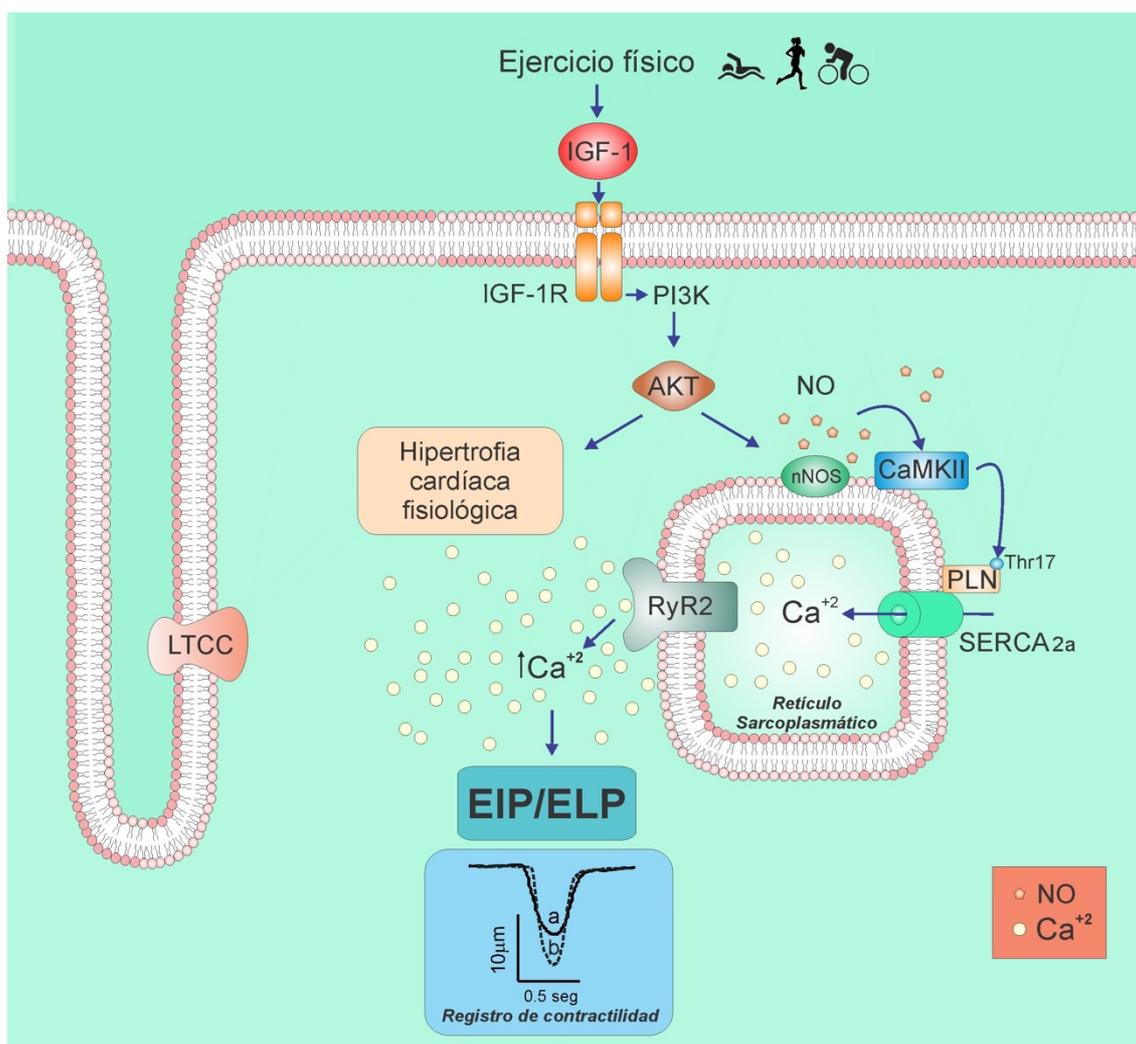


Figura 35. Resumen esquemático de los eventos moleculares propuestos en la respuesta contráctil adaptativa al ejercicio o liberación de IGF-1. En resumen, el ejercicio sostenido a través de la liberación de IGF-1, induce la fosforilación de AKT que a su vez activa nNOS, conduciendo al aumento de la producción del NO en el miocardio. Este incremento en NO sería el responsable de la activación de CaMKII, que fosforila el residuo Thr17-PLN incrementando la actividad de SERCA2a, el contenido de Ca^{2+} del RS y por lo tanto la contractilidad cardíaca. Por su parte, la vía que conduce a la HC fisiológica inducida por el entrenamiento físico no involucraría a la CaMKII. Se muestran superpuestos los registros típicos de acortamiento celular individuales antes (a) y después (b) del tratamiento con IGF-1. EIP: Efecto inotrópico positivo; ELP: Efecto lusitrópico positivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Ablorh NA** and Thomas DD. *Phospholamban phosphorylation, mutation, and structural dynamics: a biophysical approach to understanding and treating cardiomyopathy*. *Biophys Rev*. 2015; 7(1):63-76.
- **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):1200-7.
- **Ai X**, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure*. *Circ Res*. 2005; 97(12):1314-22.
- **Anderson ME**, Braun AP, Schulman H, Premack BA. *Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca(2+)-induced enhancement of the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes*. *Circ Res*. 1994; 75(5):854-61.
- **Anderson ME**. *Multiple downstream proarrhythmic targets for calmodulin kinase II: moving beyond an ion channel-centric focus*. *Cardiovasc Res*. 2007; 73(4):657-66.
- **Anderson ME**. *Pathways for CaMKII activation in disease*. *Heart Rhythm*. 2011; 8(9):1501-3.
- **Anderson ME**, Brown JH, Bers DM. *CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure*. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 51(4):468-73.
- **Anderson ME**. *Oxidant stress promotes disease by activating CaMKII*. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 89(B):160-7.
- **Anderson PA**, Greig A, Mark TM, Malouf NN, Oakeley AE, Ungerleider RM, Allen PD, Kay BK. *Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart*. *Circ Res*. 1995; 76(4):681-6.
- **Andrew PJ** and Mayer B. *Enzymatic function of nitric oxide synthases*. *Cardiovasc Res*. 1999; 43(3):521-31.
- **Ashley EA**, Sears CE, Bryant SM, Watkins HC, Casadei B. *Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes*. *Circulation*. 2002; 105:3011-6.
- **Arnold WP**. *Tar*. *Clin Dermatol*. 1997; 15(5):739-44.
- **Backs J**, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. *CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy*. *J Clin Invest*. 2006; 116(7):1853-64.
- **Backs J**, Backs T, Bezprozvannaya S, McKinsey TA, Olson EN. *Histone deacetylase 5 acquires calcium/calmodulin-dependent kinase II responsiveness by oligomerization with histone deacetylase 4*. *Mol Cell Biol*. 2008; 28(10):3437-45.
- **Backs J**, Backs T, Neef S, Kreuzer MM, Lehmann LH, Patrick DM, Grueter CE, Qi X, Richardson JA, Hill JA, Katus HA, Bassel-Duby R, Maier LS, Olson EN. *The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(7):2342-7.
- **Backs J**, Worst BC, Lehmann LH, Patrick DM, Jebessa Z, Kreuzer MM, Sun Q, Chen L, Heft C, Katus HA, Olson EN. *Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4*. *J Cell Biol*. 2011; 195(3):403-15.

- **Bai CX**, Namekata I, Kurokawa J, Tanaka H, Shigenobu K, Furukawa T. *Role of nitric oxide in Ca²⁺ sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K⁺ current in cardiac myocytes.* *Circ Res.* 2005; 96(1):64-72.
- **Balligand JL**, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. *Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(1):347-51.
- **Balligand JL**, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, et al. *Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro.* *J Biol Chem.* 1994; 269(44):27580-8.
- **Balligand JL**, Feron O, Dessy C. *eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues.* *Physiol Rev.* 2009; 89(2):481-534.
- **Barouch LA**, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, et al. *Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms.* *Nature.* 2002; 416:337-9.
- **Barouch LA**, Berkowitz DE, Harrison RW, O'Donnell CP, Hare JM. *Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice.* *Circulation.* 2003; 108(6):754-9.
- **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):488-96.
- **Bernátová I**, Pechánová O, Simko F. *Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney.* *Exp Physiol.* 1999; 84(6):1095-105.
- **Berry CE** and Hare JM. *Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications.* *J Physiol,* 2004; 555(3): 589-606.
- **Bers DM**, Li L, Satoh H, McCall E. *Factors that control sarcoplasmic reticulum calcium release in intact ventricular myocytes.* *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 853:157-77.
- **Bers DM.** *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force.* Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers. 2001.
- **Bers DM.** *Cardiac excitation-contraction coupling.* *Nature,* 2002; 415(6868):198-205.
- **Bers DM** and Guo T. *Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes.* *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1047:86-98.
- **Bers DM.** *Altered cardiac myocyte Ca²⁺ regulation in heart failure.* *Physiology (Bethesda).* 2006; 21:380-7.
- **Bers DM**, Grandi E. *Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels.* *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009; 54(3):180-7.
- **Bers DM** and Morotti S. *Ca(2+) current facilitation is CaMKII-dependent and has*

arrhythmogenic consequences. Front Pharmacol. 2014; 5:144.

- **Biffi A**, Maron BJ, Di Giacinto B, Porcacchia P, Verdile L, Fernando F, Spataro A, Culasso F, Casasco M, Pelliccia A. *Relation between training-induced left ventricular hypertrophy and risk for ventricular tachyarrhythmias in elite athletes*. Am J Cardiol. 2008; 101(12):1792-5.
- **Blumenthal DK**, Stull JT, Gill GN. *Phosphorylation of cardiac troponin by guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase*. J Biol Chem. 1978; 253:334-336.
- **Bokník P**, Heinroth-Hoffmann I, Kirchhefer U, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller T, Schmitz W, Brodde O, Neumann J. *Enhanced protein phosphorylation in hypertensive hypertrophy*. Cardiovasc Res. 2001; 51(4):717-28.
- **Bradford MM**. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 1976; 72:248-54.
- **Bradshaw JM**, Hudmon A, Schulman H. *Chemical quenched flow kinetic studies indicate an intraholoenzyme autophosphorylation mechanism for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*. J Biol Chem. 2002; 277(23):20991-8.
- **Braun AP** and Schulman H. *The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function*. Annu Rev Physiol. 1995; 57:417-45.
- **Brittsan AG**, Carr AN, Schmidt AG, Kranias EG. *Maximal inhibition of SERCA2 Ca²⁺ affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban*. J Biol Chem. 2000. 275(16):12129-35.
- **Bristow MR**. *Treatment of chronic heart failure with β -adrenergic receptor antagonists: a convergence of receptor pharmacology and clinical cardiology*. Circ Res. 2011; 109(10):1176-94.
- **Brown DA**, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA and Moore RL. *Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the K_{ATP} channel in the rat*. J Physiol. 2005; 569(3):913-924.
- **Brunner F**, Andrew P, Wölkart G, Zechner R, Mayer B. *Myocardial contractile function and heart rate in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase*. Circulation. 2001; 104(25):3097-102.
- **Burger DE**, Lu X, Lei M, Xiang FL, Hammoud L, Jiang M, Wang H, Jones DL, Sims SM, Feng Q. *Neuronal nitric oxide synthase protects against myocardial infarction-induced ventricular arrhythmia and mortality in mice*. Circulation. 2009. 120(14):1345- 54.
- **Burkard N**, Rokita AG, Kaufmann SG, Hallhuber M, Wu R, Hu K, Hofmann U, Bonz A, Frantz S, Cartwright EJ, Neyses L, Maier LS, Maier SK, Renné T, Schuh K, Ritter O. *Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility*. Circ Res. 2007; 100:e32-44.
- **Campbell DL**, Stamler JS, and Strauss HC, *Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols*. J Gen Physiol. 1996; 108(4):277-93.
- **Cappola TP**, Cope L, Cernetich A, Barouch LA, Minhas K, Irizarry RA, Parmigiani G, Durrani S, Lavoie T, Hoffman EP, Ye SQ, Garcia JG, Hare JM. *Deficiency of different nitric*

oxide synthase isoforms activates divergent transcriptional programs in cardiac hypertrophy. *Physiol Genomics.* 2003; 14(1):25-34.

- **Carrasco L**, Cea P, Rocco P, Peña-Oyarzún D, Rivera-Mejias P, Sotomayor-Flores C, Quiroga C, Criollo A, Ibarra C, Chiong M, Lavandero S. *Role of heterotrimeric G protein and calcium in cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1.* *J Cell Biochem.* 2014; 115(4):712-20.
- **Catalucci D**, Latronico MV, Ellingsen O, Condorelli G. *Physiological myocardial hypertrophy: how and why?* *Front Biosci.* 2008; 13:312-24.
- **Catalucci D**, Latronico MV, Ceci M, Rusconi F, Young HS, Gallo P, Santonastasi M, Bellacosa A, Brown JH, Condorelli G. *Akt increases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling by direct phosphorylation of phospholamban at Thr17.* *J Biol Chem.* 2009; 284(41):28180-7.
- **Chao LH**, Stratton MM, Lee IH, Rosenberg OS, Levitz J, Mandell DJ, Kortemme T, Groves JT, Schulman H, Kuriyan J. *A mechanism for tunable autoinhibition in the structure of a human Ca²⁺/calmodulin- dependent kinase II holoenzyme.* *Cell.* 2011; 146(5):732-45.
- **Champion HC**, Georgakopoulos D, Takimoto E, Isoda T, Wang Y, Kass DA. *Modulation of in vivo cardiac function by myocyte-specific nitric oxide synthase-3.* *Circ Res.* 2004; 94(5):657-63.
- **Cheng J**, Xu L, Lai D, Guilbert A, Lim HJ, Keskanokwong T, Wang Y. *CaMKII inhibition in heart failure, beneficial, harmful, or both.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012; 302(7):H1454-65.
- **Chien KR.** *Stress pathways and heart failure.* *Cell.* 1999; 98:555-558.
- **Clapham DE.** *Calcium signaling.* *Cell.* 2007; 131(6):1047-58.
- **Clusin WT.** *Calcium and cardiac arrhythmias: DADs, EADs, and alternans.* *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2003; 40(3): 337-75.
- **Colomer JM** and Means AR. *Chronic elevation of calmodulin in the ventricles of transgenic mice increases the autonomous activity of calmodulin-dependent protein kinase II, which regulates atrial natriuretic factor gene expression.* *Mol Endocrinol.* 2000; 14(8):1125-36.
- **Colomer JM**, Mao L, Rockman HA, Means AR. *Pressure overload selectively up-regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo.* *Mol Endocrinol.* 2003; 17(2):183-92.
- **Cotton JM**, Kearney MT, MacCarthy PA, Grocott-Mason RM, McClean DR, Heymes C, Richardson PJ, Shah AM. *Effects of nitric oxide synthase inhibition on Basal function and the force-frequency relationship in the normal and failing human heart in vivo.* *Circulation.* 2001; 104(19):2318-23.
- **Couchonnal LF** and Anderson ME. *The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease.* *Physiology (Bethesda).* 2008; 23:151-159.
- **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:e87495.

- **Currie S** and Smith GL. *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity is increased in sarcoplasmic reticulum from coronary artery ligated rabbit hearts.* FEBS Lett. 1999; 459(2):244-8.
- **Currie S**, Loughrey CM, Craig MA, Smith GL. *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart.* Biochem J. 2004; 377(2):357-66.
- **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 U S A. 2012; 109(44):18186-91.
- **Damy T**, Ratajczak P, Robidel E, Bendall JK, Oliviero P, Boczkowski J, Ebrahimian T, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. *Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats.* FASEB J. 2003; 17(13):1934-6.
- **Damy T**, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. *Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart.* Lancet. 2004; 363(9418):1365-7.
- **Danson EJ**, Choate JK, Paterson DJ. *Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function.* Pharmacol Ther. 2005; 106(1):57-74.
- **Dawson D**, Lygate CA, Zhang MH, Hulbert K, Neubauer S, Casadei B. *nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction.* Circulation. 2005; 112(24):3729-37.
- **Demoncheaux EA**, Higenbottam TW, Foster PJ, Borland CD, Smith AP, Marriott HM, Bee D, Akamine S, Davies MB. *Circulating nitrite anions are a directly acting vasodilator and are donors for nitric oxide.* Clin Sci (Lond). 2002; 102(1):77-83.
- **De Bosch B**, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ. *Akt1 is required for physiological cardiac growth.* Circulation. 2006; 113:2097-104.
- **De Koninck P** and Schulman H. *Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations.* Science. 1998; 279:227-30.
- **De Santiago J**, Maier LS, Bers DM. *Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban.* J Mol Cell Cardiol. 2002; 34(8):975-84.
- **Di Carlo MN**, Said M, Ling H, Valverde CA, De Giusti VC, Sommese L, Palomeque J, Aiello EA, Skapura DG, Rinaldi G, Respress JL, Brown JH, Wehrens XH, Salas MA, Mattiazzi A. *CaMKII-dependent phosphorylation of cardiac ryanodine receptors regulates cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury.* J Mol Cell Cardiol. 2014; 74:274-83.
- **Diffie GM.** *Adaptación de las propiedades contráctiles de los miocitos cardíacos al entrenamiento físico.* Exerc Sport Sci Rev. 2004; 32(3):112-9.
- **Dolmetsch RE**, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. *Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration.* Nature. 1997; 386:855-858.

- **Eijsvogels TM**, Fernandez AB, Thompson PD. *Are There Deleterious Cardiac Effects of Acute and Chronic Endurance Exercise?* *Physiol Rev.* 2016; 96(1):99-125.
- **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(3):462-74.
- **Erickson JR** and Anderson ME. *CaMKII and its role in cardiac arrhythmia.* *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2008; 19(12):1332-6.
- **Erickson JR**, He BJ, Grumbach IM, Anderson ME. *CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states.* *Physiol Rev.* 2011; 91(3):889-915.
- **Erickson JR**, Patel R, Ferguson A, Bossuyt J, Bers DM. *Fluorescence resonance energy transfer-based sensor Camui provides new insight into mechanisms of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation in intact cardiomyocytes.* *Circ Res.* 2011; 109(7):729-38.
- **Erickson JR**, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, Copeland RJ, Despa F, Hart GW, Ripplinger CM, Bers DM. *Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation.* *Nature.* 2013; 502(7471):372-6.
- **Erickson JR.** *Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart.* *Front Pharmacol.* 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):25646-56.
- **Fabiato A** and Fabiato F. *Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells.* *J Physiol.* 1975; 249(3):469-95.
- **Farah C**, Nascimento A, Bolea G, Meyer G, Gayraud S, Lacampagne A, et al. *Key role of endothelium in the eNOS-dependent cardioprotection with exercise training.* *J Mol Cell Cardiol.* 2016; 102:26-30.
- **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(3):281-91.
- **Foncea R**, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH, LeRoith D, Lavandero S. *Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes.* *J Biol Chem.* 1997; 272(31):19115-24.
- **Freestone NS**, Ribaric S, Mason WT. *The effect of insulin-like growth factor-1 on adult rat cardiac contractility.* *Mol Cell Biochem.* 1996; 163-164:223-9.
- **Frey N**, Olson EN. *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly.* *Annu Rev Physiol.* 2003; 65:45-79.
- **Furchgott RF** and Zawadzki JV. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* *Nature.* 1980; 288(5789):373-6.

- **Ellison GM**, Waring CD, Vicinanza C, Torella D. *Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms*. Heart. 2012; 98(1):5-10.
- **Gaertner TR**, Kolodziej SJ, Wang D, Kobayashi R, Koomen JM, Stoops JK, Waxham MN. *Comparative analyses of the three-dimensional structures and enzymatic properties of alpha, beta, gamma and delta isoforms of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II*. J Biol Chem. 2004; 279(13):12484-94.
- **Gallo MP**, Malan D, Bedendi I, Biasin C, Alloatti G, Levi RC. *Regulation of cardiac calcium current by NO and cGMP-modulating agents*. Pflugers Arch. 2001; 441(5):621-8.
- **Garciaarena CD**, Pinilla OA, Nolly MB, Laguens RP, Escudero EM, Cingolani HE, et al. *Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy*. Hypertension. 2009; 53:708-14.
- **Giannuzzi P**, Temporelli PL, Corra U, Tavazzi L. *Antiremodeling effect of long-term exercise training in patients with stable chronic heart failure: results of the Exercise in Left Ventricular Dysfunction and Chronic Heart Failure (ELVD-CHF) Trial*. Circulation. 2003; 108:554-9.
- **Gielen S**, Schuler G, Adams V. *Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms*. Circulation. 2010; 122:1221-38.
- **Guilbert A**, Lim HJ, Cheng J, Wang Y. *CaMKII-dependent myofilament Ca²⁺-desensitization contributes to the frequency-dependent acceleration of relaxation*. Cell Calcium. 2015; 58(5):489-499.
- **Gödecke A**, Heinicke T, Kamkin A, Kiseleva I, Strasser RH, Decking UK, Stumpe T, Isenberg G, Schrader J. *Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts*. J Physiol. 2001; 532(1):195-204.
- **Gonano LA**, Yanina Rico, Alicia Mattiazzi and Martin Vila Petroff. *CaMKII mediates cardiac glycoside toxicity*. Abstract, 55th Annual Meeting of the Biophysical Society. Baltimore, USA. 2011.
- **Gonano LA**, Morell M, Burgos JI, Dulce RA, De Giusti VC, Aiello EA, et al. *Hypotonic swelling promotes nitric oxide release in cardiac ventricular myocytes: impact on swelling-induced negative inotropic effect*. Cardiovasc Res. 2014; 104:456-66.
- **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 U S A. 2007; 104(51):20612-7.
- **Goodyear LJ**. *The exercise pill--too good to be true?* N Engl J Med. 2008; 359(17):1842-4.
- **Gutierrez DA**, Fernandez-Tenorio M, Ogrodnik J, Niggli E. *NO-dependent CaMKII activation during beta-adrenergic stimulation of cardiac muscle*. Cardiovasc Res. 2013; 100:392-401.
- **Grandi E**, Puglisi JL, Wagner S, Maier LS, Severi S, Bers DM. *Simulation of Ca-calmodulin-dependent protein kinase II on rabbit ventricular myocyte ion currents and action potentials*. Biophys J. 2007; 93(11):3835-47.

- **Griffith LC.** *Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions.* J Neurosci. 2004; 24(39):8394-8.
- **Grimm M** and Brown JH. *Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII.* J Mol Cell Cardiol. 2010; 48(2):322-30.
- **Grimm M,** Ling H, Brown JH. *Crossing signals: relationships between β -adrenergic stimulation and CaMKII activation.* Heart Rhythm. 2011; 8(8):1296-8.
- **Grueter CE,** Colbran RJ, Anderson ME. *CaMKII, an emerging molecular driver for calcium homeostasis, arrhythmias, and cardiac dysfunction.* J Mol Med. 2007; 85(1):5-14.
- **Gruetter CA,** Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro L. *Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine.* J Cyclic Nucleotide Res. 1979; 5(3):211-24.
- **Gruver CL,** DeMayo F, Goldstein MA, Means AR. *Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice.* Endocrinology. 1993; 133:376-388.
- **Guo T,** Zhang T, Mestril R, Bers DM. *Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes.* Circ Res. 2006; 99(4):398-406.
- **Hagemann D,** Bohlender J, Hoch B, Krause EG, Karczewski P. *Expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta-subunit isoforms in rats with hypertensive cardiac hypertrophy.* Mol Cell Biochem. 2001; 220(1-2):69-76.
- **Halle M,** Huonker M, Hohnloser SH, Alivertis M, Berg A, Keul J. *QT dispersion in exercise-induced myocardial hypertrophy.* Am Heart J. 1999; 138(2-1):309-12.
- **Hambrecht R,** Gielen S, Linke A, Fiehn E, Yu J, Walther C, et al. *Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: A randomized trial.* JAMA. 2000; 283:3095-101.
- **Hamdani N,** Krysiak J, Kreusser MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS. *Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation.* Circ. Res. 2013; 112:664–674.
- **Hanson PI,** Meyer T, Stryer L, Schulman H. *Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals.* Neuron. 1994; 12(5):943-56.
- **Hare JM.** *Nitric oxide and excitation-contraction coupling.* J Mol Cell Cardiol. 2003; 35(7):719-29.
- **Hayashi Y,** Nishio M, Naito Y, Yokokura H, Nimura Y, Hidaka H, Watanabe Y. *Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases.* J Biol Chem. 1999; 274(29):20597-602.
- **Haynes MP,** Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, et al. *Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells.* Circ Res. 2000; 87:677-82.
- **Hataishi R,** Rodrigues AC, Morgan JG, Ichinose F, Derumeaux G, Bloch KD, Picard MH,

Scherrer-Crosbie M. *Nitric oxide synthase 2 and pressure-overload-induced left ventricular remodeling in mice*. *Exp Physiol*. 2006; 91(3):633-9.

- **He Q**, LaPointe MC. *Interleukin-1 beta regulates the human brain natriuretic peptide promoter via Ca(2+)-dependent protein kinase pathways*. *Hypertension*. 2000; 35(1-2):292-6.
- **Heineke J**, Molkentin JD. *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(8):589-600.
- **Hempel P**, Hoch B, Bartel S, Karczewski P. *Hypertrophic phenotype of cardiac calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is reversed by angiotensin converting enzyme inhibition*. *Basic Res Cardiol*. 2002; 97(1):96-101.
- **Hidalgo CG**, Chung CS, Saripalli C, Methawasini M, Hutchinson KR, Tsapralis G, Labeit S, Mattiazzi A, Granzier HL. *The multifunctional Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements*. *J Mol Cell Cardiol*. 2013; 54:90-7.
- **Hoch B**, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. *Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium*. *Circ Res*. 1999; 84:713-21.
- **Hoelz A**, Nairn AC, Kuriyan J. *Crystal structure of a tetradecameric assembly of the association domain of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II*. *Mol Cell*. 2003; 11(5):1241-51.
- **Hogan PG**, Chen L, Nardone J, Rao A. *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. *Genes Dev*. 2003; 17:2205-2232.
- **Hu H**, Chiamvimonvat N, Yamagishi T, Marban E. *Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors*. *Circ Res*. 1997; 81(5): p. 742-52.
- **Hudmon A** and Schulman H. *Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*. *Biochem J*. 2002; 364(3):593-611.
- **Hudmon A**, Schulman H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, Pitt GS. *CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation*. *J Cell Biol*. 2005; 171(3):537-47.
- **Hunter JJ**, Chien KR. *Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure*. *N Engl J Med*. 1999; 341(17):1276-83.
- **Husain K**. *Physical conditioning modulates rat cardiac vascular endothelial growth factor gene expression in nitric oxide-deficient hypertension*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 320(4):1169-74.
- **Hussain M**, Drago GA, Bhogal M, Colyer J, Orchard CH. *Effects of the protein kinase A inhibitor H-89 on Ca²⁺ regulation in isolated ferret ventricular myocytes*. *Pflugers Arch*. 1999; 437(4):529-37.
- **Ichinose F**, Hataishi R, Wu JC, Kawai N, Rodrigues AC. *A selective inducible NOS dimerization inhibitor prevents systemic, cardiac, and pulmonary hemodynamic dysfunction in endotoxemic mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285(6):H2524-30.

- **Ichinose F**, Bloch KD, Wu JC, Hataishi R, Aretz HT, Picard MH, Scherrer-Crosbie M. *Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286(3):H1070-5.
- **Ishida A**, Kameshita I, Fujisawa H. *A novel protein phosphatase that dephosphorylates and regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*. *J Biol Chem*. 1998; 273(4):1904-10.
- **Iwasa T**, Inoue N, Miyamoto E. *Identification of a calmodulin-dependent protein kinase in the cardiac cytosol, which phosphorylates phospholamban in the sarcoplasmic reticulum*. *J Biochem*. 1985; 98(2):577-80.
- **Janssens S**, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, Jans P, Scherrer-Crosbie M, Picard MH, Szelid Z, Gillijns H, Van de Werf F, Collen D, Bloch KD. *Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction*. *Circ Res*. 2004; 94(9):1256-62.
- **Jian Z**, Han H, Zhang T, Puglisi J, Izu L T, Shaw JA, Onofiok E, Erickson JR, Chen YJ, Horvath B, Shimkunas R, Xiao W, Li Y, Pan T, Chan J, Banyasz T, Tardiff JC, Chiamvimonvat N, Bers DM, Lam KS, and Chen-Izu Y. *Mechanochemotransduction During Cardiomyocyte Contraction Is Mediated by Localized Nitric Oxide Signaling*. *Sci Signal*. 2014; 7(317):27.
- **Jiang LH**, Gawler DJ, Hodson N, Milligan CJ, Pearson HA, Porter V, Wray D. *Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase*. *J Biol Chem*. 2000; 275(9):6135-43.
- **Jin CZ**, Jang JH, Kim HJ, Wang Y, Hwang IC, Sadayappan S, Park BM, Kim SH, Jin ZH, Seo EY, Kim KH, Kim YJ, Kim SJ, Zhang YH. *Myofilament Ca²⁺ desensitization mediates positive lusitropic effect of neuronal nitric oxide synthase in left ventricular myocytes from murine hypertensive heart*. *J Mol Cell Cardiol*. 2013; 60: 107-15.
- **Jin W**, Brown AT, Murphy AM. *Cardiac myofilaments: from proteome to pathophysiology*. *Proteomics Clin Appl*. 2008; 2(6):800-10.
- **Kanaseki T**, Ikeuchi Y, Sugiura H, Yamauchi T. *Structural features of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II revealed by electron microscopy*. *J Cell Biol*. 1991; 115(4):1049-60.
- **Kaye DM**, Wiviott SD, Kelly RA. *Activation of nitric oxide synthase (NOS3) by mechanical activity alters contractile activity in a Ca²⁺-independent manner in cardiac myocytes: role of troponin I phosphorylation*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 256(2):398-403.
- **Kato T**, Sano M, Miyoshi S, Sato T, Hakuno D, Ishida H, Kinoshita-Nakazawa H, Fukuda K, Ogawa S. *Calmodulin kinases II and IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats*. *Circ Res*. 2000; 87(10):937-45.
- **Kaurstad G**, Alves MN, Kemi OJ, Rolim N, Hoydal MA, Wisløff H, et al. *Chronic CaMKII inhibition blunts the cardiac contractile response to exercise training*. *Eur J Appl Physiol*. 2012; 112:579-88.

- **Kawasaki K**, Smith RS, Jr., Hsieh CM, Sun J, Chao J, Liao JK. *Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis.* Mol Cell Biol. 2003; 23:5726-37.
- **Kelly RA**, Balligand JL, Smith TW. *Nitric oxide and cardiac function.* Circ Res. 1996; 79(3):363-80.
- **Kemi OJ**, Haram PM, Wisløff U, Ellingsen Ø. *Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining.* Circulation. 2004; 109(23):2897-904.
- **Kemi OJ**, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisløff U, Ellingsen Ø. *Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function.* Cardiovasc Res. 2005; 67(1):161-72.
- **Kemi OJ**, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, et al. *Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban.* J Mol Cell Cardiol. 2007; 43:354-61.
- **Kemi OJ**, Ceci M, Condorelli G, Smith GL, Wisløff U. *Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase function is increased by aerobic interval training.* Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2008; 15:145-8.
- **Kemi OJ**, Ellingsen O, Smith GL, Wisløff U. *Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes.* Front Biosci. 2008; 13:356-68.
- **Kemi OJ**, Ceci M, Wisløff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, Condorelli G, Ellingsen O. *Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy.* J Cell Physiol. 2008; 214(2):316-21.
- **Khan SA**, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, et al. *Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases.* Circ Res. 2003; 92:1322-9.
- **Kinugawa S**, Tsutsui H, Ide T, Nakamura R, Arimura K, Egashira K, et al. *Positive inotropic effect of insulin-like growth factor-1 on normal and failing cardiac myocytes.* Cardiovasc Res. 1999; 43:157-64.
- **Kim J**, Wende AR, Sena S, Theobald HA, Soto J, Sloan C, Wayment BE, Litwin SE, Holzenberger M, LeRoith D, Abel ED. *Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy.* Molecular endocrinology. 2008; 22:2531-43.
- **Kim SJ**, Abdellatif M, Koul S, Crystal GJ. *Chronic treatment with insulin-like growth factor I enhances myocyte contraction by upregulation of Akt-SERCA2a signaling pathway.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008; 295:H130-5.
- **Kirstein M**, Rivet-Bastide M, Hatem S, Bénardeau A, Mercadier JJ, Fischmeister R. *Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes.* J Clin Invest. 1995; 95(2):794-802.
- **Kitamoto S**, Egashira K, Kataoka C, Usui M, Koyanagi M, Takemoto M, Takeshita A. *Chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats increases aortic superoxide anion production via the action of angiotensin II.* J Hypertens. 2000; 18(12):1795-800.

- **Klee CB**, Ren H, Wang X. *Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin*. J Biol Chem. 1998; 273:13367-13370.
 - **Kojda G**, Kottenberg K, Nix P, Schlüter KD, Piper HM, Noack E. *Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes*. Circ Res. 1996; 78(1):91-101.
 - **Kokkinos P**, Myers J. *Exercise and physical activity: clinical outcomes and applications*. Circulation. 2010; 122(16):1637-48.
 - **Komeima K**, Hayashi Y, Naito Y, Watanabe Y. *Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells*. J Biol Chem. 2000; 275(36):28139-43.
 - **Kranias EG** and Hajjar RJ. *Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome*. Circ Res. 2012; 110(12):1646-60.
- Furukawa K, Ohshima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M. *Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture*. J Biol Chem. 1991; 266(19):12337-41.
- **Laemmli UK**. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 1970; 227(5259):680-5.
 - **Lai Y**, Nairn AC, Gorelick F, Greengard P. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: identification of autophosphorylation sites responsible for generation of Ca²⁺/calmodulin-independence*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84(16):5710-4.
 - **Layland J**, Solaro RJ, Shah AM. *Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation*. Cardiovasc Res. 2005; 66(1):12-21.
 - **Lederer WJ**, Colbran RJ, Anderson ME. *Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease*. Nat Med. 2005; 11:409-17.
 - **Li JM**, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. *Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure*. Hypertension. 2002; 40:477-84.
 - **Li H**, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. *Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation*. J Biol Chem. 2004; 279(17):16939-46.
 - **Li Q**, Wu S, Li SY, Lopez FL, Du M, Kajstura J, Anversa P, Ren J. *Cardiac-specific overexpression of insulin-like growth factor 1 attenuates aging-associated cardiac diastolic contractile dysfunction and protein damage*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; 292(3):H1398-403.
 - **Liao R**, Podesser BK, Lim CC. *The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012; 303(2):H156-67.
 - **Lindemann JP**, Jones L R, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM (1983). *beta-Adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca²⁺-ATPase activity in guinea pig ventricles*. J. Biol. Chem. 1985; 258 464–471.
 - **Lindemann JP** and Watanabe AM. *Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca²⁺-calmodulin-dependent mechanisms*. J Biol Chem. 1985; 260(7):4516-25.

- **Ling H**, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chen J, Bers D, Brown JH. *Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice.* J Clin Invest. 2009; 119(5):1230-40.
- **Lu L**, Mei DF, Gu AG, Wang S, Lentzner B, Gutstein DE, et al. *Exercise training normalizes altered calcium-handling proteins during development of heart failure.* J Appl Physiol (1985). 2002; 92:1524-30.
- **Lu YM**, Huang J, Shioda N, Fukunaga K, Shirasaki Y, Li XM, Han F. *CaMKII δ B mediates aberrant NCX1 expression and the imbalance of NCX1/SERCA in transverse aortic constriction-induced failing heart.* PLoS One. 2011; 6(9):e24724.
- **MacLellan WR** and Schneider MD. *Success in failure: modeling cardiac decompensation in transgenic mice.* Circulation. 1998; 97:1433-1435.
- **MacLennan DH** and Kranias EG. *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2003; 4(7):566-77.
- **Maier LS** and Bers DM. *Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heart beat to heart beat and beyond.* J Mol Cell Cardiol. 2002; 34(8):919-39.
- **Maier LS**, Braunhalter J, Horn W, Weichert S, Pieske B. *The role of SR Ca(2+)-content in blunted inotropic responsiveness of failing human myocardium.* J Mol Cell Cardiol. 2002; 34(4):455-67.
- **Maier LS**, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. *Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release.* Circ Res. 2003; 92(8):904-11.
- **Maier LS**. *CaMKII δ overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling.* Braz J Med Biol Res. 2005; 38(9):1293-302.
- **Maier LS**, Wahl-Schott C, Horn W, Weichert S, Pagel C, Wagner S, Dybkova N, Muller OJ, Nabauer M, Franz WM, Pieske B. *Increased SR Ca²⁺ cycling contributes to improved contractile performance in SERCA2a-overexpressing transgenic rats.* Cardiovasc Res. 2005; 67(4):636-46.
- **Maier LS**, Ziolo MT, Bossuyt J, Persechini A, Mestril R, Bers DM. *Dynamic changes in free Ca-calmodulin levels in adult cardiac myocytes.* J Mol Cell Cardiol. 2006; 41(3):451-8.
- **Maier LS** and Bers DM. *Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart.* Cardiovasc Res. 2007; 73(4):631-40.
- **Maier LS**, Bers DM, Brown JH. *Calmodulin and Ca²⁺/calmodulin kinases in the heart-physiology and pathophysiology.* Cardiovasc Res. 2007; 73(4):629-30.
- **Maier LS**. *Role of CaMKII for signaling and regulation in the heart.* Front Biosci (Landmark Ed). 2009; 14:486-96.
- **Maier LS**. *CaMKII regulation of voltage-gated sodium channels and cell excitability.* Heart Rhythm. 2011; 8(3):474-7.
- **Maier LS**. *Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in the heart.* Adv Exp Med Biol. 2012; 740:685-702.

- **Mangmool S**, Shukla AK, Rockman HA. *beta-Arrestin-dependent activation of Ca(2+)/calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation*. J Cell Biol. 2010; 189(3):573-87.
- **Marshall HE** and Stamler JS. *Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation*. Biochemistry. 2001; 40(6):1688-93.
- **Martin SR**, Emanuel K, Sears CE, Zhang YH, Casadei B. *Are myocardial eNOS and nNOS involved in the beta-adrenergic and muscarinic regulation of inotropy? A systematic investigation*. Cardiovasc Res. 2006; 70(1):97-106.
- **Masters BS**, McMillan K, Sheta EA, Nishimura JS, Roman LJ, Martasek P. *Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-liganded heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO as a cellular signal*. FASEB J. 1996 (2003); 10(5):552-8.
- **Massion PB**, Feron O, Dessy C, Balligand JL. *Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing*. Circ Res. 2003; 93(5):388-98.
- **Massion PB**, Pelat M, Belge C, Balligand JL. *Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2005; 142(2):144-50.
- **Massion PB** and Balligand JL. *Relevance of nitric oxide for myocardial remodeling*. Curr Heart Fail Rep. 2007; 4(1):18-25.
- **Mattiazzi A** and Kranias EG. *The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease*. Front Pharmacol. 2014; 5:5.
- **McKinsey TA** and Olson EN. *Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry*. Curr Opin Genet Dev. 1999; 9:267-274.
- **McMullen JR**, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, et al. *Phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100:12355-60.
- **McMullen JR**, Shioi T, Huang WY, Zhang L, Tarnavski O, Bisping E, et al. *The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway*. J Biol Chem. 2004; 279:4782-93.
- **Méry PF**, Lohman SM, Walter U, Fischmeister R. *Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88:1197-1201.
- **Meyer T**, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. *Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase*. Science. 1992; 256(5060):1199-202.
- **Mishra S**, Ling H, Grimm M, Zhang T, Bers DM, Brown JH. *Cardiac hypertrophy and heart failure development through Gq and CaM kinase II signaling*. J Cardiovasc Pharmacol. 2010; 56(6):598-603.
- **Mishra S**, Gray CB, Miyamoto S, Bers DM, Brown JH. *Location matters: clarifying the concept of nuclear and cytosolic CaMKII subtypes*. Circ Res. 2011; 109(12):1354-62.
- **Mohan P**, Brutsaert DL, Paulus WJ, Sys SU. *Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP*. Circulation. 1996; 93(6):1223-9.

- **Morano I**, Hadicke K, Haase H, Bohm M, Erdmann E, and Schaub MC. *Changes in essential myosin light chain isoform expression provide a molecular basis for isometric force regulation in the failing human heart.* J. Mol. Cell. Cardiol. 1997; 29:1177-1187.
- **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(52):33561-7.
- **Mungrue IN**, Bredt DS, Stewart DJ, Husain M. *From molecules to mammals: what's NOS got to do with it?* Acta Physiol Scand. 2003; 179(2):123-35.
- **Neri Serneri GG**, Boddi M, Modesti PA, Cecioni I, Coppo M, Padeletti L, et al. *Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes.* Circ Res. 2001; 89:977-82.
- **O'Neill BT**, Kim J, Wende AR, Theobald HA, Tuinei J, Buchanan J, Guo A, Zaha VG, Davis DK, Schell JC, Boudina S, Wayment B, Litwin SE, Shioi T, Izumo S, Birnbaum MJ, Abel ED. *A conserved role for phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt signaling in mitochondrial adaptations that accompany physiological cardiac hypertrophy.* Cell Metab. 2007;6:294-306.
- **Ono K**, Trautwein W. *Potential by cyclic GMP of beta-adrenergic effect on Ca²⁺ current in guinea-pig ventricular cells.* J Physiol. 1991; 443:387-404.
- **Oestreich EA**, Malik S, Goonasekera SA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV. *Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II.* J Biol Chem. 2009; 284(3):1514-22.
- **Orrenius S**, Gogvadze V, and Zhivotovsky B. *Calcium and mitochondria in the regulation of cell death.* Biochem Biophys Res Commun. 2015; 460(1):72-81.
- **Palmer RM**, Ashton DS, and Moncada S. *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.* Nature. 1988; 333(6174):664-6.
- **Palomeque J**, Rueda OV, Sapia L, Valverde CA, Salas M, Petroff MV, Mattiazzi A. *Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca²⁺ dependence of Ca²⁺-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species.* Circ Res. 2009; 105:1204-12.
- **Passier R**, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR, Olson EN. *CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo.* J Clin Invest. 2000; 105(10):1395-406.
- **Pechánová O**, Bernátová I, Pelouch V, Simko F. *Protein remodelling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril.* J Mol Cell Cardiol. 1997; 29(12):3365-74.
- **Pechanova O** and Simko F. *The role of nuclear factor kappa B and nitric oxide interaction in heart remodelling.* J Hypertens. 2010; 28(1):S39-44.
- **Pereira L**, Métrich M, Fernández-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, Morel E, Fischmeister R, Richard S, Bénitah JP, Lezoualc'h F, Gómez AM. *The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes.* J Physiol. 2007; 583(2):685-94.

- **Pereira L**, Ruiz-Hurtado G, Morel E, Laurent AC, Métrich M, Domínguez-Rodríguez A, Lauton-Santos S, Lucas A, Benitah JP, Bers DM, Lezoualc'h F, Gómez AM. *Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes*. J Mol Cell Cardiol. 2012; 52(1):283-91.
- **Pereira L**, Bare DJ, Galice S, Shannon TR, Bers DM. *β -Adrenergic induced SR Ca²⁺ leak is mediated by an Epac-NOS pathway*. J Mol Cell Cardiol. 2017; 108:8-16.
- **Pinsky DJ**, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T. *Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart*. Circ Res. 1997; 81(3):372-9.
- **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(11):1159-67.
- **Porzio MA** and Pearson AM. *Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*. Biochim Biophys Acta. 1977; 490(1):27-34.
- **Prendergast BD**, Sagach VF, Shah AM. *Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart*. Circulation. 1997; 96(4):1320-9.
- **Raeymaekers L**, Hofmann F, and Casteels R. *Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle*. Biochem J. 1988; 252(1):269-73.
- **Rang HP**, Dale MM, Ritter JM, J Flower, and G. Henderson. Pharmacology. 8th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 2005.
- **Ramirez MT**, Zhao XL, Schulman H, Brown JH. *The nuclear deltaB isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes*. J Biol Chem. 1997; 272(49):31203-8.
- **Rellos P**, Pike AC, Niesen FH, Salah E, Lee WH, von Delft F, Knapp S. *Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation*. PLoS Biol. 2010; 8(7):e1000426.
- **Ren J**, Walsh MF, Hamaty M, Sowers JR, Brown RA. *Altered inotropic response to IGF-I in diabetic rat heart: influence of intracellular Ca²⁺ and NO*. Am J Physiol. 1998; 275:H823-30.
- **Ren J**, Jefferson L, Sowers JR, Brown RA. *Influence of age on contractile response to insulin-like growth factor 1 in ventricular myocytes from spontaneously hypertensive rats*. Hypertension. 1999; 34:1215-22.
- **Reppel M**, Fleischmann BK, Reuter H, Sasse P, Schunkert H, Hescheler J. *Regulation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) in the murine embryonic heart*. Cardiovasc Res. 2007; 75(1):99-108.
- **Reynaert NL**, Ckless K, Korn SH, Vos N, Guala AS, Wouters EF, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. *Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(24):8945-50.
- **Richter EA**, Kiens B, Wojtaszewski JF. *Can exercise mimetics substitute for exercise?* Cell Metab. 2008; 8(2):96-8.

- **Rolim N**, Skårdal K, Høydal M, Sousa MM, Malmo V, Kaurstad G, Ingul CB, Hansen HE, Alves MN, Thuen M, Haraldseth O, Brum PC, Slupphaug G, Loennechen JP, Stølen T, Wisløff U. *Aerobic interval training reduces inducible ventricular arrhythmias in diabetic mice after myocardial infarction*. Basic Res Cardiol. 2015; 110(4):44.
- **Rolim NP**, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, et al. *Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure*. Physiological genomics. 2007; 29:246-52.
- **Roof SR**, Tang L, Ostler JE, Periasamy M, Gyorke S, Billman GE, Ziolo MT. *Neuronal nitric oxide synthase is indispensable for the cardiac adaptive effects of exercise*. Basic Res Cardiol. 2013; 108:332.
- **Roof SR**, Ho HT, Little SC, Ostler JE, Brundage EA, Periasamy M, Villamena FA, Györke S, Biesiadecki BJ, Heymes C, Houser SR, Davis JP, Ziolo MT. *Obligatory role of neuronal nitric oxide synthase in the heart's antioxidant adaptation with exercise*. J Mol Cell Cardiol. 2015; 81:54-61.
- **Ruetten H**, Dimmeler S, Gehring D, Ihling C, Zeiher AM. *Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload*. Cardiovasc Res. 2005; 66(3):444-53.
- **Sadoshima J**, Izumo S. *The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress*. Annu Rev Physiol. 1997; 59:551– 571.
- **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; 2:664-75.
- **Sahn DJ**, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. *Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements*. Circulation. 1978; 58(6):1072-83.
- **Said M**, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A. *The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation*. Pflugers Arch. 2002; 444(6):801-9.
- **Said M**, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C, Ferrero P, Kranias EG, Mattiazzi A. *Role of dual-site phospholamban phosphorylation in the stunned heart: insights from phospholamban site-specific mutants*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; 285(3):H1198-205.
- **Said M**, Becerra R, 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(6):936-44.
- **Saito T**, Fukuzawa J, Osaki J, Sakuragi H, Yao N, Haneda T, Fujino T, Wakamiya N, Kikuchi K, Hasebe N. *Roles of calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in pressure overload-induced cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol. 2003; 35(9):1153-60.
- **Sapia L**, Mattiazzi A and Vila Petroff MG. *Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by ouabain induces CaMKII-dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes*. J Mol Cell Cardiol.

2010; 49:106-12.

- **Salas MA**, Valverde CA, Sánchez G, Said M, Rodriguez JS, Portiansky EL, Kaetzel MA, Dedman JR, Donoso P, Kranias EG, Mattiazzi A. *The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol. 2010; 48(6):1298-306.
- **Saraiva RM**, Minhas KM, Raju SV, Barouch LA, Pitz E, Schuleri KH, Vandegaer K, Li D, Hare JM. *Deficiency of neuronal nitric oxide synthase increases mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of nitroso-redox equilibrium*. Circulation. 2005; 112(22):3415-22.
- **Scheinowitz M**, Kessler-Icekson G, Freimann S, Zimmermann R, Schaper W, Golomb E, Savion N, Eldar M. *Short- and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression*. Growth Horm IGF Res. 2003; 13:19-25.
- **Schulman H** and Greengard P. *Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator"*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978; 75(11):5432-6.
- **Sears CE**, Bryant SM, Ashley EA, Lygate CA, Rakovic S, Wallis HL, et al. *Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling*. Circ Res. 2003; 92:e52-9.
- **Seddon M**, Melikian N, Dworakowski R, Shabeeh H, Jiang B, Byrne J, Casadei B, Chowienczyk P, Shah AM. *Effects of neuronal nitric oxide synthase on human coronary artery diameter and blood flow in vivo*. Circulation. 2009; 119:2656–2662.
- **Seddon M**, Shah AM, Casadei B. *Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling*. Cardiovasc Res. 2007; 75(2):315-26.
- **Sei CA**, Irons CE, Sprenkle AB, McDonough PM, Brown JH, Glembotski CC. *The alpha-adrenergic stimulation of atrial natriuretic factor expression in cardiac myocytes requires calcium influx, protein kinase C, and calmodulin-regulated pathways*. J Biol Chem. 1991; 266:15910-15916.
- **Sepulveda M**, Gonano LA, Back TG, Chen SR, Vila Petroff M. *Role of CaMKII and ROS in rapid pacing-induced apoptosis*. J Mol Cell Cardiol. 2013; 63:135-45.
- **Sepulveda M**, Gonano LA, Viotti M, Morell M, Blanco P, López Alarcón M, Peroba Ramos I, Bastos Carvalho A, Medei E, Vila Petroff M. *Calcium/Calmodulin Protein Kinase II-Dependent Ryanodine Receptor Phosphorylation Mediates Cardiac Contractile Dysfunction Associated With Sepsis*. Crit Care Med. 2017; 45(4):e399-e408.
- **Sessa WC**, Barber CM, Lynch KR. *Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein*. Circ Res. 1993; 72(4):921-4.
- **Shah AM** and MacCarthy PA. *Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function*. Pharmacol Ther. 2000; 86(1):49-86.
- **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(28):13333-41.

- **Smith RS**, Agata J, Xia CF, Chao L, Chao J. *Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction*. *Life Sci*. 2005; 76(21):2457-71.
- **Song T**, Hatano N, Kambe T, Miyamoto Y, Ihara H, Yamamoto H, Sugimoto K, Kume K, Yamaguchi F, Tokuda M, Watanabe Y. *Nitric oxide-mediated modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. *Biochem J*. 2008; 412(2):223-31.
- **Sossalla S**, Maurer U, Schotola H, Hartmann N, Didié M, Zimmermann WH, Jacobshagen C, Wagner S, Maier LS. *Diastolic dysfunction and arrhythmias caused by overexpression of CaMKII δ (C) can be reversed by inhibition of late Na(+) current*. *Basic Res Cardiol*. 2011; 106(2):263-72.
- **Stoyanovsky D**, Murphy T, Anno PR, Kim YM, Salama G. *Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors*. *Cell Calcium*. 1997; 21(1):19-29.
- **Sun J**, Steenbergen C, Murphy E. *S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress*. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8(9-10):1693-705.
- **Sumii K** and Sperelakis N. *cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes*. *Circ Res*. 1995; 77(4):803-12.
- **Swulius MT** and Waxham MN. *Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinases*. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65(17):2637–2657.
- **Takimoto E**, Champion HC, Belardi D, Moslehi J, Mongillo M, Mergia E, Montrose DC, Isoda T, Aufiero K, Zaccolo M, Dostmann WR, Smith CJ, Kass DA. *cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism*. *Circ Res*. 2005; 96(1):100-9.
- **Takasago T**, Imagawa T, Furukawa K, Ogurusu T, Shigekawa M. *Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation*. *J Biochem*. 1991; 109(1):163-70.
- **Tobimatsu T** and Fujisawa H. *Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs*. *J Biol Chem*. 1989; 264(30):17907-12.
- **Tokumitsu H**, Muramatsu Ma, Ikura M, Kobayashi R. *Regulatory mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase*. *J Biol Chem*. 2000; 275(26):20090-5.
- **Tong CW**, Gaffin RD, Zawieja DC, Muthuchamy M. *Roles of phosphorylation of myosin binding protein-C and troponin I in mouse cardiac muscle twitch dynamics*. *J. Physiol*. 2004; 558:927–941.
- **Troncoso R**, Díaz-Elizondo J, Espinoza SP, Navarro-Marquez MF, Oyarzún AP, Riquelme JA, Garcia-Carvajal I, Díaz-Araya G, García L, Hill JA, Lavandero S. *Regulation of cardiac autophagy by insulin-like growth factor 1*. *IUBMB Life*. 2013; 65(7):593-601.
- **Troncoso R**, Ibarra C, Vicencio JM, Jaimovich E, Lavandero S. *New insights into IGF-1 signaling in the heart*. *Trends Endocrinol Metab*. 2014; 25:128-37.
- **Uemura A**, Naito Y, Matsubara T, Hotta N, Hidaka H. *Demonstration of a Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase cascade in the hog heart*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 249(2):355-60.
- **Ungvari Z** and Csiszar A. *The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular*

aging: recent advances. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2012; 67(6):599-610.

- **Valverde C**, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Vittone L, Salas M, Palomeque J, Vila Petroff M, Mattiazzi A. *Frequency-dependent acceleration of relaxation in mammalian heart: A property not relying on phospholamban and SERCA2a phosphorylation*. J. Physiol. 2005; 562:801-13.
- **van Empel VP** and De Windt LJ. *Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act*. Cardiovasc Res. 2004; 63(3):487-99.
- **van Oort RJ**, McCauley MD, Dixit SS, Pereira L, Yang Y, Respress JL, Wang Q, De Almeida AC, Skapura DG, Anderson ME, Bers DM, Wehrens XH. *Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure*. Circulation. 2010; 122(25):2669-79.
- **Vandsburger MH**, French BA, Helm PA, Roy RJ, Kramer CM, Young AA, Epstein FH. *Multi-parameter in vivo cardiac magnetic resonance imaging demonstrates normal perfusion reserve despite severely attenuated beta-adrenergic functional response in neuronal nitric oxide synthase knockout mice*. Eur Heart J. 2007; 28(22):2792-8.
- **Vetter SW** and Leclerc E. *Novel aspects of calmodulin target recognition and activation*. Eur J Biochem. 2003; 270(3):404-14.
- **Vetter U**, Zapf J, Heit W, Helbing G, Heinze E, Froesch ER, Teller WM. *Human fetal and adult chondrocytes. Effect of insulinlike growth factors I and II, insulin, and growth hormone on clonal growth*. J Clin Invest. 1986; 77(6):1903-8.
- **Vetter U**, Kupferschmid C, Lang D, Pentz S. *Insulin-like growth factors and insulin increase the contractility of neonatal rat cardiocytes in vitro*. Basic Res Cardiol. 1988; 83(6):647-54.
- **Vielma AZ**, León L, Fernández IC, González DR, Boric MP. *Nitric Oxide Synthase 1 Modulates Basal and β -Adrenergic-Stimulated Contractility by Rapid and Reversible Redox-Dependent S-Nitrosylation of the Heart*. PLoS One. 2016; 11(8):e0160813.
- **Vila Petroff MG**, Lakatta EG and Sollott AJ. *Activation of Distinct cAMP- and cGMP-Dependent Pathways by Nitric Oxide (NO) in Cardiac Myocytes*. Circulation Research. 1999; 84:1020-1031.
- **Vila Petroff MG**. *Rol y Mecanismos Subcelulares del Óxido Nítrico en la Regulación de la Contractilidad Miocárdica*. Revista de la Federación Argentina de Cardiología 2000; 29:501-507.
- **Vila Petroff MG**, Kim SH, Pepe S, Dessy C, Marbán E, Balligand JL, Sollott S. *Endogenous Nitric Oxide Mechanisms Mediate the Stretch-dependency of Ca^{2+} -Release in Cardiomyocytes*. Nature, Cell Biology. 2001; 3:867-873.
- **Vila Petroff MG**, Salas M, Said M, Valverde C, Sapia L, Portiansky E, Hajjar R, Kranias Evangelia G, Mundiña-Weilenmann C, Mattiazzi A. *CaMKII-Inhibition Protects against Necrosis and Apoptosis in the Irreversible Ischemia-Reperfusion Injury*. Cardiovasc Res. 2007; 73:689-98.
- **Vila Petroff MG**, Mundiña-Weilenmann C, Lezcano N, Snabaitis AK, Huergo MA, Valverde CA, Avkiran M, Mattiazzi A. *Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to intracellular pH recovery from acidosis via Na(+)/H(+)*

exchanger activation. J Mol Cell Cardiol. 2010; 49:106-12.

- **Vittone L**, Mundiña C, Chiappe de Cingolani G, Mattiazzi A. *cAMP and calcium-dependent mechanisms of phospholamban phosphorylation in intact hearts*. Am J Physiol. 1990; 258(2- 2):H318-25.
- **Vittone L**, Mundina-Weilenmann C, Mattiazzi A. *Phospholamban phosphorylation by CaMKII under pathophysiological conditions*. Front Biosci. 2008; 13:5988-6005.
- **von Lewinski D**, Voss K, Hülsmann S, Kögler H, Pieske B. *Insulin-like growth factor-1 exerts Ca²⁺-dependent positive inotropic effects in failing human myocardium*. Circ Res. 2003; 92(2):169-76.
- **Wahler GM** and Dollinger SJ. *Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase*. Am J Physiol. 1995; 268(1-1):C45-54.
- **Wagner S**, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels*. J Clin Invest. 2006; 116(12):3127-38.
- **Wagner S**, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, Sowa T, Fabritz L, Kirchhof P, Bers DM, Maier LS. *Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents*. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2009; 2(3):285-94.
- **Wang B**, Xu M, Li W, Li X, Zheng Q, Niu X. *Aerobic exercise protects against pressure overload-induced cardiac dysfunction and hypertrophy via β₃-AR-nNOS-NO activation*. PLoS One. 2017; 12(6):e0179648.
- **Wang H**, Kohr MJ, Traynham CJ, Wheeler DG, Janssen PM, Ziolo MT. *Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban*. Am J Physiol Cell Physiol. 2008; 294(6):C1566-75.
- **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(15):2905-17.
- **Wang Y** and Marsden PA. *Nitric oxide synthases: gene structure and regulation*. Adv Pharmacol. 1995; 34:71-90.
- **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.
- **Wildhirt SM**, Weismueller S, Schulze C, Conrad N, Kornberg A, Reichart Bt. *Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury*. Cardiovasc Res. 1999; 43(3):698-711.
- **Wilkins BJ**, Molkentin JD. *Calcium-calmodulin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy*. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 322:1178-1191.
- **Wink DA**, Hanbauer I, Laval F, Cook JA, Krishna MC, Mitchell JB. *Nitric oxide protects against the cytotoxic effects of reactive oxygen species*. Ann N Y Acad Sci. 1994; 738:265-78.

- **Wisløff U**, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, Ellingsen O. *Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats.* Cardiovasc Res. 2001; 50(3):495-508.
- **Wisløff U**, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum Ø, Haram PM, Tjønnha AE, Helgerud J, Slørdahl SA, Lee SJ, Videm V, Bye A, Smith GL, Najjar SM, Ellingsen Ø, Skjaerpe T. *Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study.* Circulation. 2007; 115(24):3086-94.
- **Wu X**, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM. *Local IP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling.* J Clin Invest. 2006; 116: 675-82.
- **Wu Y**, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ, Anderson ME. *Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy.* Circulation. 2002; 106(10):1288-93.
- **Xiao B**, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, Ter Keurs H, Chen SR. *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(1):7-16.
- **Xu KY**, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. *Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(2):657-62.
- **Xu KY**, Kuppusamy SP, Wang JQ, Li H, Cui H, Dawson TM, Huang PL, Burnett AL, Kuppusamy P, Becker LC. *Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia-induced inactivation.* J Biol Chem. 2003; 278(43):41798-803.
- **Xu L**, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. *Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation.* Science. 1998; 279(5348):234-7.
- **Xu L**, Lai D, Cheng J, Lim HJ, Keskanokwong T, Backs J, Olson EN, Wang Y. *Alterations of L-type calcium current and cardiac function in CaMKII δ knockout mice.* Circ Res. 2010; 107(3):398-407.
- **Yamniuk AP** and Vogel HJ. *Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides.* Mol Biotechnol. 2004; 27(1):33-57.
- **Yang B**, Larson DF and Watson RR. *Modulation of iNOS activity in age-related cardiac dysfunction.* Life Sci. 2004; 75(6):655-67.
- **Yang KC**, Foeger NC, Marionneau C, Jay PY, McMullen JR, Nerbonne JM. *Homeostatic regulation of electrical excitability in physiological cardiac hypertrophy.* J Physiol. 2010; 588:5015-32.
- **Yang L**, Jia Z, Zhu M, Zhang J, Liu J, Wu P, et al. *Exercise protects against chronic beta-adrenergic remodeling of the heart by activation of endothelial nitric oxide synthase.* PLoS One. 2014; 9:e96892.
- **Yang Y**, Zhu WZ, Joiner ML, Zhang R, Oddis CV, Hou Y, Yang J, Price EE, Gleaves L, Eren M, Ni G, Vaughan DE, Xiao RP, Anderson ME. *Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 291(6):H3065-75.

- **Yeves AM**, Villa-Abrille MC, Perez NG, Medina AJ, Escudero EM, Ennis IL. *Physiological cardiac hypertrophy: Critical role of AKT in the prevention of NHE-1 hyperactivity*. J Mol Cell Cardiol. 2014; 76C:186-95.
- **Yuan W** and Bers DM. *Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase*. Am J Physiol. 1994; 267(3-2):H982-93.
- **Zahradníková A**, Minarovic I, Venema RC, Mészáros LG. *Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide*. Cell Calcium. 1997; 22(6):447-54.
- **Zhang DM**, Chai Y, Erickson JR, Brown JH, Bers DM, Lin YF. *Intracellular signalling mechanism responsible for modulation of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels by nitric oxide in ventricular cardiomyocytes*. J Physiol. 2014; 592(5):971-90.
- **Zhang M**, Hagenmueller M, Riffel JH, Kreusser MM, Bernhold E, Fan J, Katus HA, Backs J, Hardt SE. *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II couples Wnt signaling with histone deacetylase 4 and mediates dishevelled-induced cardiomyopathy*. Hypertension. 2015; 65(2):335-44.
- **Zhang P**, Xu X, Hu X, van Deel ED, Zhu G, Chen Y. *Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure*. Circ Res. 2007; 100(7):1089-98.
- **Zhang R**, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE Jr, Thiel W, Guatimosim S, Song LS, Madu EC, Shah AN, Vishnivetskaya TA, Atkinson JB, Gurevich VV, Salama G, Lederer WJ, Colbran RJ, Anderson ME. *Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease*. Nat Med. 2005; 11(4):409-17.
- **Zhang T**, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H, Ross J Jr, Brown JH. *The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity*. J Biol Chem. 2002; 277(2):1261-7.
- **Zhang T**, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J Jr, Bers DM, Brown JH. *The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure*. Circ Res. 2003; 92(8):912-9.
- **Zhang T** and Brown JH. *Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure*. Cardiovasc Res. 2004; 63(3):476-86.
- **Zhang T**, Miyamoto S, Brown JH. *Cardiomyocyte calcium and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: friends or foes?* Recent Prog Horm Res. 2004; 59:141-68.
- **Zhang T**, Kohlhaas M, Backs J, Mishra S, Phillips W, Dybkova N, Chang S, Ling H, Bers DM, Maier LS, Olson EN, Brown JH. *CaMKII delta isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses*. J Biol Chem. 2007; 282(48):35078-87.
- **Zhang YH**, Zhang MH, Sears CE, Emanuel K, Redwood C, El-Armouche A, Kranias EG, Casadei B. *Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice*. Circ Res. 2008; 102(2):242-9.
- **Zhang YH**, Dingle L, Hall R, Casadei B. *The role of nitric oxide and reactive oxygen*

species in the positive inotropic response to mechanical stretch in the mammalian myocardium. Biochim Biophys Acta. 2009; 1787(7):811-7.

- **Zhang YH** and Casadei B. *Sub-cellular targeting of constitutive NOS in health and disease.* J Mol Cell Cardiol. 2012; 52(2):341-50.
- **Zhang YH**, Jin CZ, Jang JH, Wang Y. *Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology.* J Physiol. 2014; 592(15):3189-200.
- **Zhang YH.** *Nitric oxide signalling and neuronal nitric oxide synthase in the heart under stress.* F1000Res. 2017; 6:742.
- **Zhou YY**, Cheng H, Song LS, Wang D, Lakatta EG, Xiao RP. *Spontaneous beta(2)-adrenergic signaling fails to modulate L-type Ca(2+) current in mouse ventricular myocytes.* Mol Pharmacol. 1999; 56(3):485-93.
- **Zhu W**, Zou Y, Shiojima I, Kudoh S, Aikawa R, Hayashi D, Mizukami M, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. *Ca2+/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy.* J Biol Chem. 2000; 275(20):15239-45.
- **Zhu WZ**, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H, Xiao RP. *Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca2+/calmodulin kinase II.* J Clin Invest. 2003; 111(5):617-25.
- **Zhu WZ**, Woo AY, Yang D, Cheng H, Crow MT, Xiao RP. *Activation of CaMKIIdeltaC is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis.* J Biol Chem. 2007; 282:10833-9.
- **Ziolo MT**, Katoh H, Bers DM. *Positive and negative effects of nitric oxide on Ca(2+) sparks: influence of beta-adrenergic stimulation.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 281(6):H2295-303.
- **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(24):2961-6.
- **Ziolo MT**, Maier LS, Piacentino V, Bossuyt J, Houser SR, Bers DM. *Myocyte nitric oxide synthase 2 contributes to blunted beta-adrenergic response in failing human hearts by decreasing Ca2+ transients.* Circulation. 2004; 109(15):1886-91.
- **Ziolo MT.** *The fork in the nitric oxide road: cyclic GMP or nitrosylation?* Nitric Oxide. 2008; 18(3):153-6.
- **Ziolo MT**, Kohr MJ, Wang H. *Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function.* J Mol Cell Cardiol. 2008; 45(5):625-32.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema tridimensional de la CaM y su sitio de unión a CaMKII.....	19
Figura 2. Diagrama de la estructura de una subunidad de la CaMKII.....	20
Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de autoregulación de la CaMKII por la interacción con Ca ²⁺ -CaM.....	21
Figura 4. Esquema de los mecanismos de activación propuestos para CaMKII.....	23
Figura 5. Esquema representativo de los principales eventos intracelulares que se producen durante el AEC.....	25
Figura 6. Representación esquemática del receptor de rianodina tipo 2, que incluye ejemplos de su regulación por fosforilación por PKG, PKA y CaMKII.....	28
Figura 7. Representación esquemática de la regulación de la SERCA2a por PLN.....	29
Figura 8. Diagrama de la activación de CaMKII δ cardíaca en HC.....	35
Figura 9. Diagrama esquemático de la estructura dimérica de la NOS, mostrando los sitios de unión a sustratos y cofactores.....	38
Figura 10. Esquema de la localización y la señalización fisiopatológica de las diferentes isoformas constitutivas de la NOS en el miocardio.....	46
Figura 11. Imágenes fotográficas de la rutina de entrenamiento de los ratones nadadores.....	56
Figura 12. Registro de ecocardiografía del corazón de ratón.....	57
Figura 13. Sistema de perfusión de tipo Langendorff para el aislamiento de cardiomiocitos ventriculares de ratón.....	58
Figura 14. Imagen de miocitos cardiacos ventriculares de ratón aislados mediante digestión enzimática.....	59
Figura 15. Esquema que muestra los componentes elementales del sistema de microscopía adaptado para experimentos de fluorescencia.....	61
Figura 16. Parámetros contráctiles evaluados.....	62
Figura 17. Imágenes fotográficas del corazón montado en un sistema de Langendorff y perfundido en forma retrógrada a través de la aorta.....	64
Figura 18. El IGF-1 produce un efecto inotrópico positivo (EIP) que depende de la activación de nNOS y CaMKII.....	69
Figura 19. Efecto de los inhibidores farmacológicos, en ausencia de IGF-1, sobre el acortamiento celular respecto del valor basal.....	70
Figura 20. El IGF-1 produce un efecto lusitrópico positivo (ELP) dependiente de la activación de nNOS y CaMKII.....	71
Figura 21. Los inhibidores farmacológicos sin el agregado de IGF-1 no afectaron el tiempo a la mitad de la relajación respecto del valor basal.....	71
Figura 22. El IGF-1 estimula la producción de NO en cardiomiocitos de ratón adulto de manera dependiente de la isoforma nNOS.....	73
Figura 23. Los inhibidores farmacológicos por sí solos no tuvieron efecto sobre la fluorescencia de DAF-FM respecto del valor basal.....	74

Figura 24. El IGF-1 aumenta la actividad de AKT y nNOS.....	75
Figura 25. El tratamiento agudo con IGF-1 no modificó la expresión de nNOS.....	76
Figura 26. El IGF-1 activa CaMKII de una manera dependiente de nNOS y mejora el manejo de Ca ²⁺ del RS.....	77
Figura 27. Efecto directo del donante de NO sobre la actividad de CaMKII en corazones perfundidos de ratón.....	78
Figura 28. La expresión de un péptido inhibidor de CaMKII previene el EIP y el ELP del IGF-1.....	80
Figura 29. Efecto del IGF-1 sobre el transitorio de Ca ²⁺ y el contenido de Ca ²⁺ del RS.....	82
Figura 30. El protocolo de ejercicio indujo el desarrollo de HC fisiológica y la adaptación contráctil en ratones WT nadadores.....	84
Figura 31. Activación de la vía de señalización mediada por CaMKII e inducida por la rutina de entrenamiento en ratones WT.....	85
Figura 32. La HC fisiológica inducida por la rutina de natación no depende de la activación de CaMKII.....	87
Figura 33. Efecto del ejercicio sobre la actividad de la CaMKII y la de sus blancos específicos en ratones WT y transgénicos.....	89
Figura 34. Papel destacado de CaMKII para la adaptación contráctil inducida por el ejercicio.....	90
Figura 35. Resumen esquemático de los eventos moleculares propuestos en la respuesta contráctil adaptativa al ejercicio o la liberación de IGF-1.....	104