

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
Centro de Investigaciones Cardiovasculares-Cátedra de Fisiología y Física
Biológica



**“DISECCIÓN DE LOS MECANISMOS SUBCELULARES
RESPONSABLES DEL FENÓMENO DE LA ESCALERA
NEGATIVA Y LA APOPTOSIS EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA
USANDO UN MODELO CELULAR.”**

TESIS DOCTORAL

Luciana Sapia

Director

Dr. Martín Vila Petroff

Profesor adjunto de la Cátedra de Fisiología y Física Biológica
Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.
Investigador Independiente (CONICET).

Codirectora

Dra. Alicia R. Mattiazzi

Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.
Investigadora Principal (CONICET).
Directora del Centro de Investigaciones Cardiovasculares.

Año 2009

INTRODUCCIÓN	1
LA INSUFICIENCIA CARDÍACA (IC)	2
1 PRINCIPALES ESTRUCTURAS QUE CONFORMAN LA CÉLULA CARDÍACA	3
1.1 El sarcolema	4
1.1.1 Canales de calcio tipo L	5
1.1.2 El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)	6
1.1.3 La bomba Na^+/K^+ -ATPasa	7
1.1.4 ATPasa sarcolemal	9
1.2. El Retículo Sarcoplásmático	9
1.2.1 Receptor de rianodina (RyR)	10
1.2.2 La bomba de Ca^{2+} del RS-SERCA	11
1.2.3 Fosfolamban (PLN)	12
1.3 Las mitocondrias	12
1.4 Los miofilamentos	13
1.5. El núcleo	16
2. ACOPLAMIENTO ÉXCITO-CONTRÁCTIL EN EL CORAZÓN NORMAL	17
2.1 Relajación miocárdica	21
2.2 Modulación de la contractilidad	22
2.2.1 Mecanismos fisiológicos que regulan la contractilidad.	23
3. DISFUNCIÓN CONTRÁCTIL EN LA IC	28
3.1 Alteraciones del AEC	28
3.1.1 Canales de Ca^{2+} tipo L	29
3.1.2 SERCA2a	29
3.1.3 NCX	30
3.1.4 Regulación del Na^+ intracelular	30
3.1.5 Alteraciones de la relación fuerza-frecuencia (acortamiento-frecuencia) en la IC	32
3.2 Muerte celular en la IC	34
3.2.1 Apoptosis	35
3.2.2 Necrosis	38
3.3 Posibles mecanismos desencadenantes de la apoptosis en la IC	39
OBJETIVOS	42
1. OBJETIVOS GENERALES	43

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3. HIPÓTESIS	44
METODOLOGÍA	46
Aspectos Generales	47
1. AISLAMIENTO DE MIOCITOS	47
2. CULTIVO DE LOS MIOCITOS	48
3. INFECCIÓN CON ADENOVIRUS	49
3.1 Verificación de la expresión de proteínas recombinantes	49
4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA SERCA2a	49
5. MEDIDAS DE LA FLUORESCENCIA DE INDO-1 Y ACORTAMIENTO CELULAR	50
6. MEDIDAS DE Na_i^+ EN MIOCITOS AISLADOS	51
7. MEDIDAS DE VIABILIDAD CELULAR	52
8. MEDIDAS DE APOPTOSIS	52
9. PREPARACIÓN DE MUESTRAS, ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT	53
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
RESULTADOS	56
1. RESULTADOS PARTE 1	57
1.1 Inhibición de la SERCA2a: estrategia farmacológica y de transferencia génica	57
1.2 Efecto de la inhibición de la SERCA2a en la relación acortamiento-frecuencia	60
1.3 Estudio del efecto del aumento de Na_i^+ en la relación acortamiento-frecuencia	61
1.4 Efecto de la sobreexpresión del NCX sobre la relación acortamiento-frecuencia	63
1.5 Combinación múltiple de las alteraciones básicas del manejo del Ca^{2+} y su influencia sobre la inducción de la escalera negativa	65
1.5.1 Miocitos tratados con 10 μM de ouabaína y 1 μM de Tg	65
1.5.2 Miocitos tratados con 10 μM de ouabaína e infectados con Ad.NCX	66
1.5.3 Miocitos cultivados e infectados con Ad.NCX e incubados con 1 μM de Tg	67
1.5.4 Miocitos cultivados e infectados con Ad.NCX y tratados con 10	67

μM de ouabaina y $1 \mu\text{M}$ de Tg	
2. RESULTADOS PARTE 2	72
2.1 Efecto de la elevación del Na^+ sobre la viabilidad celular	72
2.2 Mecanismos de muerte celular	74
2.3 Estudio de los segundos mensajeros involucrados en la cascada apoptótica inducida por la ouabaina	76
2.3.1 Inhibición del modo reverso del NCX	76
2.3.2 Estudio del rol de la proteína quinasa Ca^{2+} /calmodulina-dependiente (CaMKII) en la cascada apoptótica	77
DISCUSIÓN	81
1. LA ESCALERA NEGATIVA DE LA IC	83
1.1. El modelo	83
1.2. En miocitos sanos, alteraciones individuales en el manejo del Ca^{2+} no son suficientes para invertir la relación fuerza-frecuencia (acortamiento-frecuencia) positiva	84
1.3. Múltiples alteraciones determinan una relación fuerza-frecuencia (acortamiento-frecuencia) negativa	86
2. LA APOPTOSIS EN LA IC	88
2.1. Aumento en la concentración de Na^+ intracelular como mecanismo de apoptosis	89
2.2. Mecanismos que conducen a la muerte celular inducida por la elevación del Na^+ ,	89
2.2.1 Rol del NCX	89
2.2.2 Rol de la CaMKII	90
CONCLUSIONES FINALES	93
BIBLIOGRAFÍA	95
APÉNDICE	113
1.Apéndice 1	114

A Martín A y Nico por ser los
amores de mi vida...

A mi mamá por estar SIEMPRE.

GRACIAS

Al Dr. Martín Vila, por haber sido mi director, por haber entendido mis momentos difíciles y por la formación científica que me brindó y que siempre voy a llevar de acá en adelante.

A la Dra. Alicia Mattiazzi, por ser mi codirectora, por haberme permitido entrar al Centro de Investigaciones Cardiovasculares, por la excelente formación científica, el excelente ejemplo moral y de trabajo que brinda diariamente, y por estar siempre disponible para todos.

A Margarita Salas, porque su aliento me llevó adelante, por el asesoramiento constante que me brindó en lo científico, académico y principalmente en lo espiritual... gracias de nuevo.

A Cecilia Mundiña-Weilenmann, por el excelente asesoramiento científico y haber sido un ejemplo de trabajo para mí.

A Julieta Palomeque por su colaboración y aporte en esta tesis.

A Charly por haberme enseñado tanto en la parte bioquímica, por haberme enseñado a preguntarme más las cosas y también por ser un excelente compañero.

A Mónica Rando, por enseñarme a aislar miocitos, por los mejores mates del mundo y por ser mi amiga.

A Omar Velez Rueda, porque su humor me ayudó a pasar malos momentos y por estar siempre en todo.

A Miriam, Romi, Juliana, Verito, (voy a extrañar nuestras corridas), Alejandra, Vero, Nacho, Carolina, Andrés; Cecilia Alvarez; por compartir el día a día, los mates, las charlas y por estar más allá del laboratorio.

A Irene por el asesoramiento científico y personal.

A todos los integrantes del Centro por estar siempre y con la mejor predisposición: Albita, Martín P, Noelia, Rosana, Emanuel, Alicia Rodríguez y Cecilia.

A los investigadores que siempre tuvieron la mejor predisposición para resolver cualquier problema que se pudiera presentar: H. Cingolani, Alejandro, Gende, Gustavo, Venosa, Claudia, Leticia, Matilde, Susana y Chichita

A mi gran familia, a mi papá por transmitirme tantas cosas y por estar, a Fabián por todo lo que es conmigo y por ser su hija también, a mi tía Jorgelina por quererme tanto y sin su apoyo todo hubiera sido muy difícil, a Román por ser mi hermano y enseñarme a ver todo desde otro lado, a mi hermana Marina por su manera de quererme, a laia por ser la mejor abuela del mundo, a Marta, a Rody y a la abuela Tina por el amor increíble que nos dan todos los días, mis tíos y primos, y a mi mamá por TODO.

A mis amigos, por estar siempre y ser mi cable a tierra, Silvia, Ale, Vale, Naty, Dani, Fede, Lía, Aye, Moni, Meli, Naty y Mele (gracias por las charlas con cervezas y maní).

A Martín A, por todo lo que hacés por mi, porque estas en todo, por tu apoyo, por la felicidad plena que me das y por tu amor.

A Nico porque su llegada al mundo fue el motor que me hizo salir adelante cuando las cosas parecían imposibles y por hacerme tan feliz.

INTRODUCCIÓN

LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

La insuficiencia cardíaca (IC) es una de las más importantes causas de morbi-mortalidad en adultos en todo el mundo incluso en nuestro país (Fairman, 2001). En términos simples, la IC es el estado en el cual el corazón es incapaz de bombear la cantidad suficiente de sangre necesaria para cubrir las demandas metabólicas del organismo (Bers, 2001). Esta alteración de la función cardíaca genera una serie de mecanismos compensadores, que a su vez implican cambios o exigencias que en el tiempo representan cargas nuevas que contribuyen a la progresión de esta patología. La hipertensión, los desordenes valvulares y los daños por isquemia son entre otros factores los principales desencadenantes de IC (Braunwald, 2000). Quizás uno de los desafíos actuales más importantes del fisiólogo es conocer cuáles son las bases celulares de la disfunción contráctil en la IC, aunque en la actualidad está descrito que la disfunción contráctil que exhiben los corazones insuficientes es en parte debida a una alteración en el manejo de Ca^{2+} intracelular (Hasenfuss, 2002) y recientemente se ha reconocido además, que la pérdida de los miocitos producida por un proceso muy regulado denominado apoptosis o muerte celular programada, podría jugar un importante papel en la progresión de la IC y en el deterioro de la función contráctil (Gill, 2002). Las bases subcelulares de estos fenómenos, hasta el momento no están aclaradas. Existen gran cantidad de modelos experimentales de IC en donde se han estudiado las bases celulares de la misma. Los resultados obtenidos aunque genuinos, no son coincidentes y es difícil hacer una descripción generalizada para todos los modelos de IC. Para una mejor comprensión de los mecanismos subcelulares de la insuficiencia cardíaca resulta fundamental hacer una primera descripción de los elementos que componen el miocardio y que intervienen en el acoplamiento excito contráctil (AEC), entendiendo como tal a la serie de procesos que ocurren a nivel celular desde la despolarización de la membrana celular hasta la contracción de la célula cardíaca.

1. PRINCIPALES ESTRUCTURAS QUE CONFORMAN LA CÉLULA CARDÍACA

El corazón es un órgano vital cuya función es promover la circulación de la sangre a través del sistema circulatorio. Para cumplir con esta función el tejido cardíaco cuenta con células musculares estriadas altamente diferenciadas denominadas miocitos cardíacos, las cuales son capaces de desarrollar fuerza contráctil organizada. Los miocitos cardíacos representan aproximadamente el 30% del número total de células cardíacas, pero dado su gran tamaño constituyen más del 75% del volumen del órgano (Frank, 1974).

Los miocitos cardíacos varían en su forma y tamaño. Desde una simple elipse hasta un cilindro con ramificaciones y son varias veces más largos que anchos. Su diámetro varía entre 10 y 20 μm . Los miocitos adyacentes están conectados por estructuras denominadas discos intercalares. Un segmento de estos discos -la unión estrecha (*gap junction*)- constituye una unión de baja resistencia eléctrica, lo que permite una rápida transmisión de los impulsos de célula a célula e implica una contracción simultánea de todas las fibras. Las *gap junction* están formadas por agregados hexaméricos de proteínas individuales denominadas conexinas (ver figura 1).

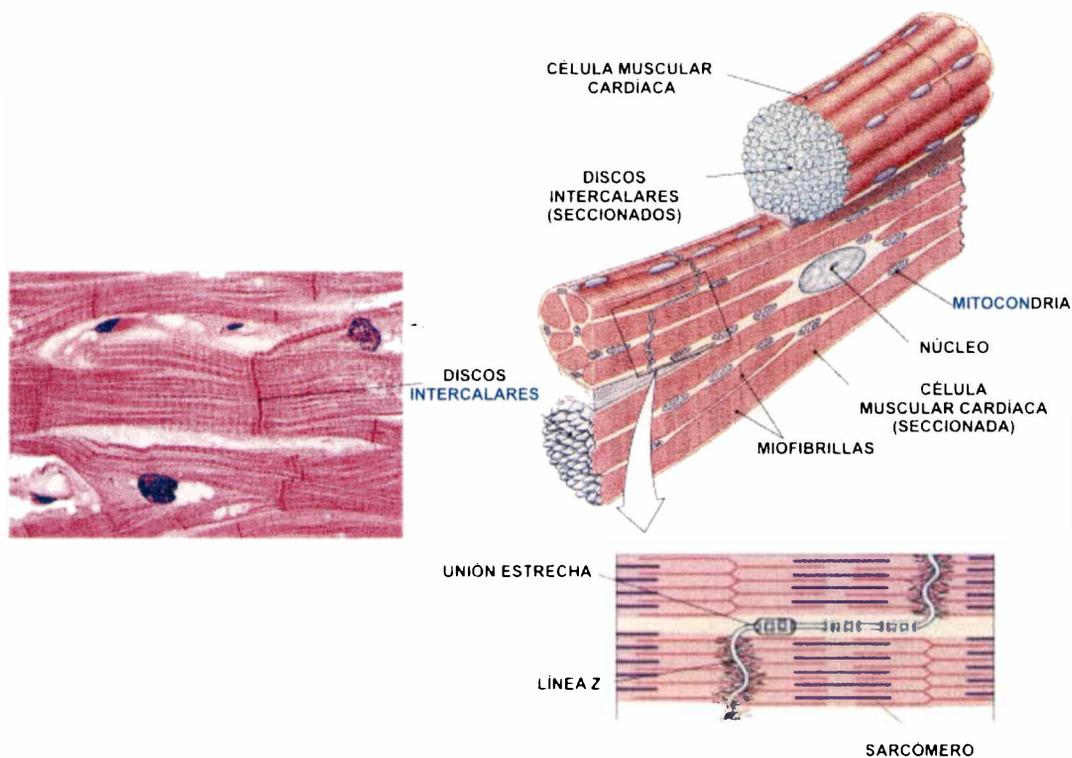


Figura 1. Organización subcelular del músculo cardíaco. Elementos claves de la estructura cardíaca. El miocardio adulto está compuesto principalmente por células musculares estriadas (miocitos cardíacos) organizadas como un sincitio funcional. Los miocitos adyacentes están conectados por los discos intercalares. Dentro del miocito cardíaco los sarcómeros se disponen en serie constituyendo las miofibrillas y generan una óptima arquitectura para la contracción.

1.1 El sarcolema.

La membrana celular, plasmalema, o sarcolema en el caso de una célula muscular, es una membrana especializada. Esta presenta invaginaciones, *túbulos transversales* o *túbulos t* que posibilitan un estrecho contacto entre el espacio extracelular y las miofibrillas. El sarcolema representa una barrera física entre el medio intracelular (citósol) y el medio extracelular. Por fuera de esta membrana existe una cubierta formada fundamentalmente por glicoproteínas, mucopolisacáridos y la membrana basal. Todo este complejo sarcolema-glicocalix posee numerosos sitios cargados negativamente, con una gran afinidad por el ion Ca^{2+} . El Ca^{2+} unido a estos sitios desempeña un papel fundamental en el AEC.

A continuación se realizará una breve descripción de los principales componentes del sarcolema que participan en el AEC.

1.1.1 Canales de calcio tipo L

Los canales de calcio tipo son canales que facilitan la entrada de Ca^{2+} a la célula. Si bien en los miocitos se encuentran dos tipos de canales de Ca^{2+} tipo L y tipo T, la corriente de Ca^{2+} que generan los de tipo L (aperturas de larga duración, gran conductancia, y grandes despolarizaciones) es la corriente dominante en los miocitos. La corriente de tipo T (pequeña conductancia y apertura transitoria), está presente en células de la aurícula y en las células del sistema de conducción eléctrica y no puede ser detectada en la mayoría de los miocitos. Los canales de tipo L son característicamente sensibles a las 1-4 dihidropiridinas (DHPs) que bloquean el canal (antagonistas cálcicos como la nifedipina, nisoldipina) o promueven la apertura del mismo (agonistas cálcicos como BayK 8644), por lo cual también se los conoce como receptores de DHP (DHPR). Ambos tipos de canales son operados por voltaje es decir se abren con la despolarización del sarcolema (Bers, 2002). Los DHPR son complejos polipeptídicos que comprenden diferentes subunidades. Las subunidades de transmembrana en el tejido cardiaco son α_{1c} y δ (dependiendo el tejido existe una subunidad γ). La subunidad citosólica se denomina β y la extracelular α_2 , codificada por genes diferentes (ver figura 2 para conocer su estructura). La subunidad α_{1c} conforma la estructura por la cual ingresa el Ca^{2+} . Esta subunidad es un poro ión-selectivo, formado por cuatro repeticiones de un dominio con seis segmentos transmembrana y es el sensor del voltaje; además poseería sitios fosforilables específicos para la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), la proteína dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII) y la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y de fosfolípidos (PKC), que regulan su actividad. Mientras que α_2/δ y β son subunidades accesorias encargadas de regular las propiedades biofísicas del canal (Boda, 2005).

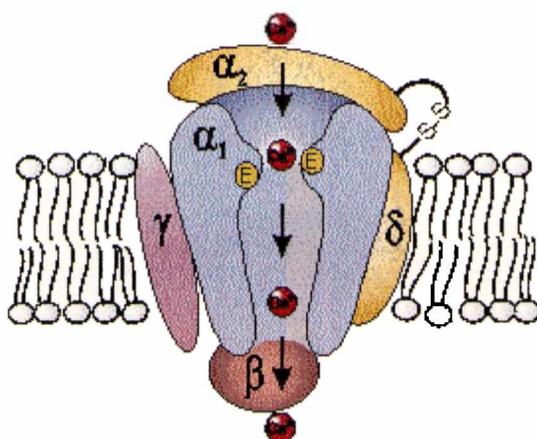


Figura 2. Dibujo esquemático de la estructura del canal de Ca^{2+} tipo L. La subunidad principal α_1 tiene 4 dominios y forma el poro del canal. Las subunidades α_2 , δ y β regulan las propiedades del canal (en este esquema se muestra a la subunidad γ , también con función regulatoria).

1.1.2 El intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX).

El NCX es una proteína integral de membrana que promueve el transporte de tres iones Na^+ por cada ión de Ca^{2+} en direcciones opuestas, a través de un proceso que no requiere energía y es electrogénico (Homma, 2006). El NCX se encuentra en la membrana plasmática de la mayor parte de las células de los mamíferos. Existen tres isoformas (Linck, 1998) derivadas de tres genes diferentes: NCX1 específico del músculo cardíaco, NCX2 específico del músculo esquelético y NCX3 específico de cerebro. La expresión del NCX ocurre en etapas muy tempranas de la cardiogénesis. En mamíferos normales el nivel de expresión del NCX1 es máximo cerca del nacimiento, y luego va disminuyendo en la vida postnatal (Boerth, 1994). El NCX posee 938 aminoácidos (aa) y nueve segmentos transmembrana (figura 3), con el extremo amino terminal glicosilado (péptido señal) orientado hacia el espacio extracelular. Posee además un gran lazo interno hidrofílico (entre los aa 250 y 796) entre los segmentos transmembrana 5 y 6, el cual es importante para la regulación alostérica intracelular por Ca^{+2} o Na^+ (Matsuoka, 1993) y posee una región denominada XIP (péptido inhibitorio de intercambio). Próximos a los extremos amino y carboxilo terminal se conocen dos secuencias repetidas de 40 aa llamadas repeticiones α -1 y α -2 que se encuentran conservadas en todos los NCX de la familia y que cumplirían un importante rol en el transporte de iones (Di Polo, 2006). Este intercambiador posee dos modos de

compartimentos intracelulares. La bomba está compuesta por una subunidad catalítica α (de aproximadamente 110 kDa) que es la encargada del transporte de iones, una subunidad regulatoria β (de aproximadamente 35 Kda) que asegura el correcto procesamiento y anclaje en la membrana (Xie, 2003) y una pequeña subunidad hidrofóbica γ (de aproximadamente 12 kDa) (ver figura 4). La función fisiológica de esta subunidad no está bien establecida hasta el momento (Glitsch, 2001). De acuerdo a las variantes de la subunidad α se describen diferentes isoformas de la bomba de Na^+ ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$) las cuales tienen diferentes afinidades por el Na^+ y por los glucósidos cardiotónicos. En los miocitos de rata la isoforma α_1 se expresa preferencialmente en los túbulos T (colocalizada con los canales de Na^+ y el NCX) mientras que la subunidad α_2 se distribuye en la membrana de manera más homogénea. Esta subunidad posee 10 dominios transmembrana y la cola amino y carboxilo terminales ubicadas intracelularmente. Los dominios 1-2,5-6 y 7-8 parecen ser lo sitios mas importantes de unión de los glucósidos cardiotónicos (como por ej. la ouabaína). Estos compuestos son inhibidores específicos de la bomba de Na^+ y han sido utilizados por más de 200 años en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva. Estos compuestos, al inhibir parcialmente a la bomba Na^+/K^+ ATPasa producen un aumento del Na^+ intracelular suficiente para favorecer el funcionamiento del NCX en modo reverso, lo que provoca un aumento de Ca^{2+} intracelular y por ende un aumento en la contractilidad.

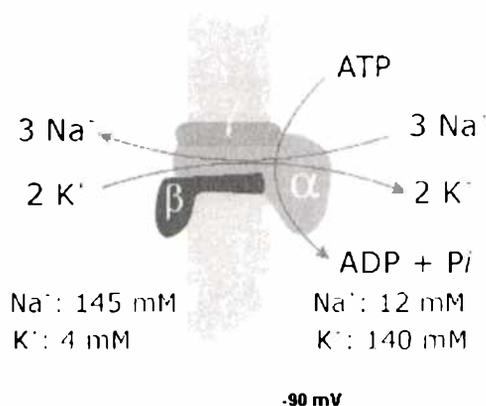


Figura 4. Esquema de la bomba Na^+/K^+ ATPasa en la membrana celular. El trabajo necesario para expulsar 3 iones Na^+ contra su gradiente electroquímico e ingresar 2 iones K^+ se realiza mediante la hidrólisis de una molécula de ATP. En la figura aparecen las concentraciones intracelulares y extracelulares de Na^+ y K^+ y el potencial de membrana en reposo de un miocito ventricular.

1.1.4 ATPasa sarcolemal

La ATPasa sarcolemal es una proteína también miembro de la familia de ATPasas tipo P, tiene un peso de 138 Kda y posee cuatro isogenes (PMCA1-4), además de poseer numerosas variantes de "splicing" (Carafoli, 1994).

Esta bomba es otro mecanismo sarcolemal responsable de la extrusión de Ca^{2+} hacia el espacio extracelular. La misma es capaz de transportar un ión Ca^{2+} en contra de su gradiente de concentración, por cada molécula de ATP hidrolizada. Aunque experimentos en miocitos aislados de conejo demuestran que la participación de esta bomba en la extrusión de Ca^{2+} fuera de la célula durante la relajación cardíaca es inferior al 1% (Bassani, 1994), en otros tipos celulares puede ser la principal responsable de la extrusión de Ca^{2+} .

A continuación se exponen los componentes intracelulares del AEC.

1.2. El Retículo Sarcoplásmático

El retículo sarcoplásmático (RS) es el principal reservorio de Ca^{2+} de la célula y su principal función es el secuestro y liberación de Ca^{2+} desde y hacia el citosol, de modo que interviene en dos procesos importantes de la célula, la contracción y la relajación. El RS es un extenso sistema de membranas intracelulares constituido por cisternas y túbulos anastomosados entre sí que rodean a cada miofibrilla. Cada segmento de RS inicia y termina en una cisterna terminal denominada RS de unión que junto con los túbulos transversos conforman unas estructuras denominadas tríadas. En el músculo cardíaco la tríada no está tan organizada como lo está en el músculo esquelético. El RS de unión posee los canales liberadores de Ca^{2+} , receptores de rianodina (RyR) de los que hablaré más adelante, que se proyectan a modo de pies hacia la superficie citoplasmática e interaccionan con los DHPR contenidos en los túbulos T. Existen otros canales liberadores de Ca^{2+} , denominados receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R) (Walker, 1987; Ferris, 1989; Chadwick, 1990), pero en el RS cardíaco el RyR tiene un rol mucho más relevante en el AEC.

Las zonas que no se encuentran en la cercanía de los túbulos T están constituidas por membranas tubulares. Esta porción contiene una alta densidad de bombas transportadoras de Ca^{2+} (SERCA) como también se verá mas

adelante. La función principal del RS es secuestrar Ca^{2+} como depósito y liberarlo al citoplasma para la contracción del músculo. Esta organela es capaz de almacenar concentraciones de Ca^{2+} entre 50 y 250 μM , que superan ampliamente el Ca^{2+} necesario para un ciclo de contracción (en el orden de 1 μM) (Bers, 2001).

A continuación se detallarán las principales estructuras del RS.

1.2.1 Receptor de rianodina (RyR)

A los receptores de rianodina se los denominó de esta manera debido a la alta afinidad por el alcaloide vegetal rianodina. El RyR es un homotetrámero de aproximadamente 2.260 kDa con subunidades de aproximadamente 560 kDa (Nakai, 1990). El tetrámero adopta una forma similar a un "trébol" en el dominio citoplasmático denominada pié. Además posee un dominio de transmembrana más pequeño que formaría el canal propiamente dicho. Cada unidad del RyR tiene un sitio donde se fija Ca^{2+} y uno donde se fija la rianodina, además de sitios de unión a distintos ligandos que regularían su función. Cada unidad está además asociada a una proteína denominada FKBP12 en el músculo esquelético y FKBP12.6 en el cardíaco (también conocida como calstabin2) (para revisión ver: Weherens, 2004), por ser capaz de unirse a una droga denominada FK506. Estas se encuentran orientadas hacia el citosol y serían vitales para la apertura coordinada de los receptores RyR (Marx, 2000). También se pueden mencionar otras proteínas de anclaje como ser mAKAP que se asocia con la proteína quinasa A (PKA), las fosfatasas PP1 y PP2a. Hacia el lumen del RS existe una interacción entre la proteína de unión de Ca^{2+} (calsequestrina, CSQ) y dos proteínas de membrana pequeñas (junctina y triadina) que se unen a CSQ y RyR formando un complejo cuaternario de CSQ-triadina-junctina-RyR (ver figura 5). Existen tres isoformas genéticamente diferentes de receptores de RyR en los mamíferos: RyR1, RyR2 y RyR3. RyR1 es la isoforma dominante del músculo esquelético, RyR2 es dominante en el músculo cardíaco y RyR3 se distribuye ubicuamente en varios tejidos incluido el muscular. (Ogawa, 2000). Por técnicas de criofractura se observó que en el músculo esquelético hay moléculas de RyR posicionadas en la membrana del RS cercana al túbulo T en forma de tetrámero que se alinean de manera estricta con cuatro moléculas de DHPR en la membrana del túbulo-T opuesta

(Block, 1998). En el músculo cardíaco no se cumple este estricto alineamiento entre DHPR y RyR. De hecho la relación DHPR/RyR en el corazón es considerablemente mas baja que en el músculo esquelético (Bers, 1993).

La liberación de Ca^{2+} del RS cardíaco estaría mediada principalmente por el RyR2 y en parte por los IP_3 .

Complejo RyR2

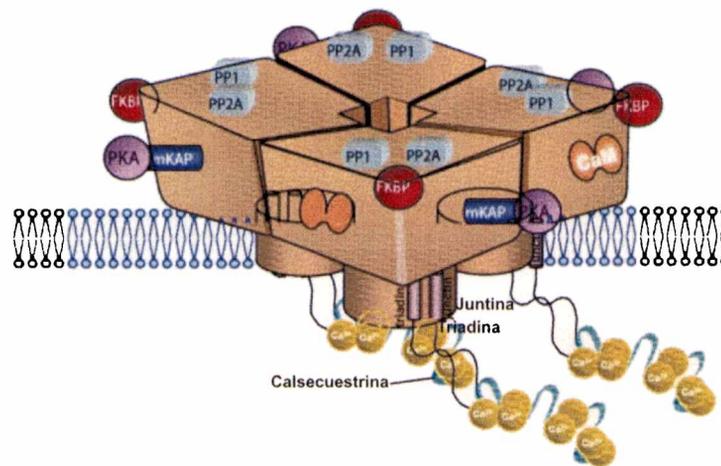


Figura 5. Diagrama esquemático del complejo macromolecular receptor de rianodina cardíaco (RyR2) y proteínas asociadas. Este incluye cuatro subunidades de RyR2 idénticas, cada una es capaz de unir una FKBP12.6, así como también fosfatasa y quinasas (PP1, PP2A, CaMKII, PKA). Además se encuentran asociadas al complejo proteínas tales como CSQ, CaM, sorcina, triadina, junctina, etc.

1.2.2 La bomba de Ca^{2+} del RS-SERCA.

La SERCA (bomba de Ca^{2+} sarcoplásmica) es un miembro de la familia de enzimas ATPasas tipo P, transportadoras de iones. Esta familia está constituida por el producto de tres genes homólogos (SERCA1, 2 y 3). Estos codifican cinco isoformas de la SERCA: SERCA1a y SERCA1b (isoformas del músculo esquelético rápido), SERCA2a (isoforma principal del músculo esquelético lento y cardíaco), SERCA 2b (isoforma principal en el músculo liso) y SERCA3 (presente en células musculares y no musculares). A continuación se referirá a la estructura de la SERCA2a que está presente en las células musculares cardíacas. La SERCA2a consta de tres regiones principales, designadas como cabeza citoplásmica, tallo y dominio transmembrana. La

SERCA2a cumple un rol fundamental en el AEC, ya que es la encargada de bombear Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior del RS oponiéndose al gradiente químico existente. Para cumplir con esto es necesario que se hidrolice una molécula de ATP a fin de transportar dos iones Ca^{2+} . La velocidad con que la SERCA bombea Ca^{2+} es regulada en el músculo cardíaco por una proteína del RS denominada *fosfolamban*.

1.2.3 Fosfolamban (PLN)

PLN es una proteína de tan sólo 52 aminoácidos que actúa como inhibidor endógeno de la SERCA2a. Se expresa principalmente en músculo cardíaco y en menor medida en músculo esquelético lento, en músculo liso y en células endoteliales. Se la divide en tres dominios, el dominio amino-terminal IA (citosólico), dominio IB (citosólico) y el dominio carboxi-terminal II (transmembrana). El dominio IA posee estructura de α -hélice y es el que contiene los residuos fosforilables Ser¹⁰, Ser¹⁶ y Thr¹⁷. El dominio II posee estructura de cierre leucina-isoleucina, importante para la estabilización inter monómero (Simmerman, 1996). La interacción entre la PLN y la SERCA2a regula la actividad de la bomba de Ca^{2+} del RS. PLN se asocia con SERCA2a en tres sitios, uno en cada dominio de PLN. Con estas interacciones, PLN limita los cambios conformacionales de la SERCA2a. Esto se traduce en una disminución de la afinidad de la SERCA2a por el Ca^{2+} , así como un ralentamiento del ciclo de hidrólisis de ATP de la bomba y del transporte de Ca^{2+} . La fosforilación en Ser¹⁶ y Thr¹⁷, así como el aumento de la concentración de Ca^{2+} , revierten la inhibición que ejerce PLN sobre la SERCA2a (Asahi, 2000).

1.3 Las mitocondrias

Las mitocondrias ocupan una porción substancial del volumen citoplasmático de las células eucariotas. La función principal de la mitocondria es la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa mediante la cadena transportadora de electrones. Todos los pasos enzimáticos de la degradación oxidativa de glúcidos, grasas y aminoácidos convergen en esta etapa final de respiración celular en la que los electrones fluyen desde intermedios catabólicos al O_2 produciendo energía para la producción de ATP a partir de

ADP y P_i (Lenhinger, 1995) Además de este papel fundamental en el metabolismo energético, las mitocondrias pueden servir como depósito de sustancias como iones, agua, etc. También pueden acumular cantidades masivas de Ca^{2+} . Con respecto a este punto, cada vez son más los descubrimientos que llevan a adjudicarle a las mitocondrias un papel de suma importancia en los mecanismos de manejo de Ca^{2+} de los miocitos cardíacos. Se ha descrito que las mitocondrias de los cardiomiocitos acumulan Ca^{2+} cuando éste aumenta durante la sístole (Sedova, 2006). Sin embargo, el grado de contribución de las mitocondrias al ciclo y la cinética del Ca^{2+} en el AEC permanecen muy controvertidos (Dedkova, 2008).

Recientes estudios demuestran que las mitocondrias juegan un rol crucial en la regulación de la muerte celular programada o apoptosis. La disfunción de la mitocondria producida por daño del ADN u otros factores genotóxicos llevan a una pérdida del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) de las mismas, que llevan a un punto irreversible en la ejecución de la cascada de muerte celular (Jeong, 2008)

1.4 Los miofilamentos

Los miofilamentos en células del ventrículo de mamíferos ocupan 45-60% del volumen celular. Los miofilamentos son la maquinaria contráctil de la célula y representan el efector final responsable de traducir la energía química en energía mecánica y trabajo. El sarcómero es la unidad contráctil fundamental en el músculo estriado y está delimitado por la línea Z (Katz, 1977) (figura 6). Cada sarcómero está compuesto por un conjunto de filamentos gruesos y finos interdigitados entre sí. Cada filamento grueso tiene una longitud aproximada de 1,55 μm y está compuesto por una proteína llamada miosina. La miosina es una proteína de alto peso molecular que tiene forma de bastón y posee una cola que está orientada hacia el centro del sarcómero y una cabeza globular flexible que se orienta hacia los discos Z. La cabeza de miosina es la base del puente cruzado, tiene actividad ATPasa y capacidad de unirse a la actina. Los filamentos finos tienen una longitud aproximada de 1 μm y se extienden desde la línea Z hasta el centro del sarcómero. Están compuestos principalmente por una proteína denominada actina y por otras proteínas regulatorias, la troponina y la tropomiosina (el-Saleh, 1986; Katz, 1977). Los filamentos finos están

compuestos por monómeros de una proteína globular denominada actina G que se ordenan formando el filamento (figura 7). Estos filamentos se disponen en pares de hélices α . La tropomiosina es una molécula delgada y alargada que se extiende en todo el filamento fino. La troponina está constituida por la troponina T (TnT), la I (TnI) y la C (TnC). El conjunto de estas tres se denomina complejo troponínico. La TnT es la que une el complejo troponínico a la tropomiosina, la TnI inhibe, junto con la tropomiosina, la interacción entre la actina y la miosina, y la TnC tiene la capacidad de unirse al Ca^{2+} (figura 8).

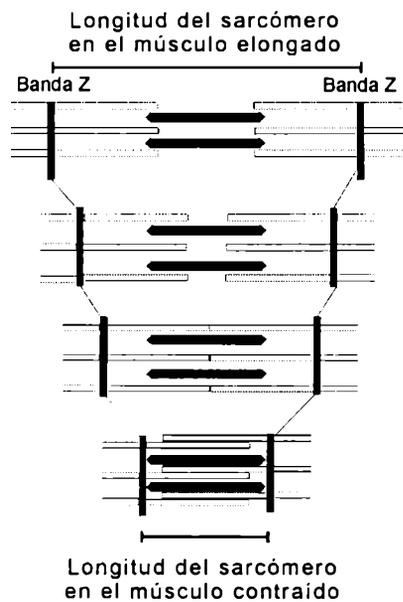


Figura 6. *Esquema de un sarcómero.* Sección longitudinal de un sarcómero en distintos grados de acortamiento. Se observa claramente como aunque el sarcómero se acorte, la longitud de las proteínas contráctiles no se modifica. Miosina en negro, actina en blanco. (Modificado de Cingolani HE, Houssay AB y colaboradores. Fisiología Humana de Houssay. Sección I. Fisiología General (ed) El Ateneo 2000, pp 59-94, Buenos Aires).

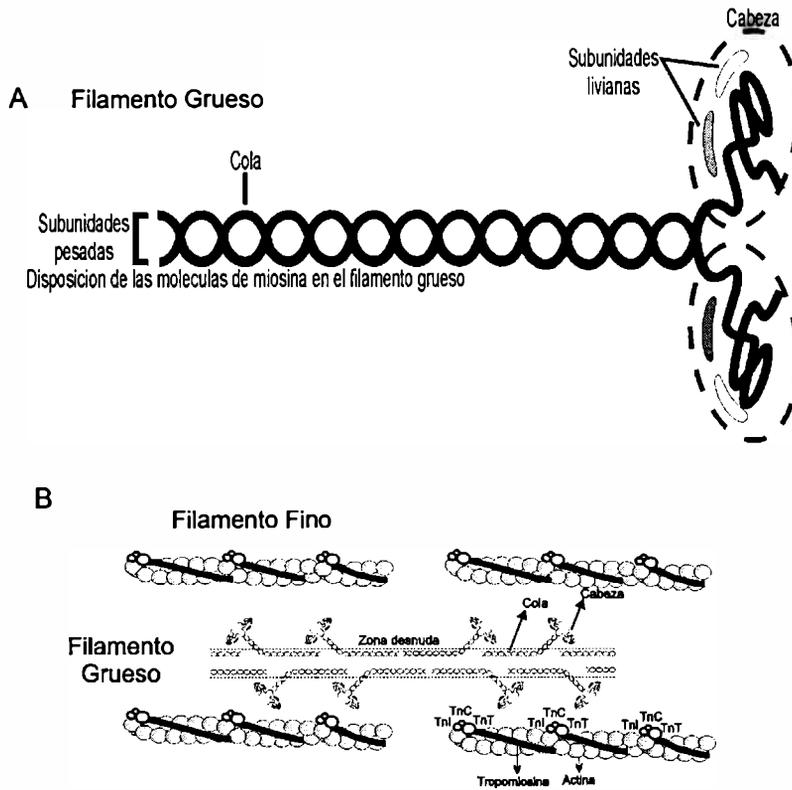


Figura 7. Miofilamentos. Panel A: Representación esquemática de una molécula de miosina. Las colas están formadas por dos cadenas pesadas enroscadas entre sí hasta un extremo en donde se separan y enroscan sobre sí mismas, formando la cabeza. Las colas dan rigidez al filamento, las cabezas salen del mismo constituyendo los puentes cruzados. Panel B: Esquema del filamento fino donde se muestra la disposición de la actina (círculos grises), tropomiosina (Tm), troponina I (Tn I), troponina C (Tn C) y la troponina T (Tn T). (Modificado de Cingolani HE, Houssay AB y colaboradores. Fisiología Humana de Houssay. Sección I. Fisiología General (ed) El Ateneo 2000, pp 59-94, Buenos Aires).

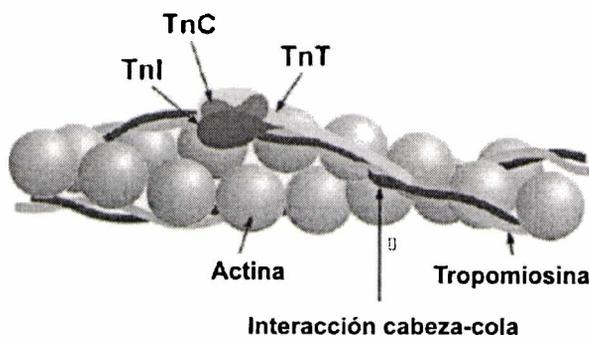


Figura 8. Complejo troponínico. Esquema que muestra la disposición de los filamentos finos de actina junto al complejo troponínico y la tropomiosina.

Las proteínas arriba mencionadas son las principales protagonistas de la contracción, pero también existen otras proteínas muy importantes del sarcómero, por ejemplo: la titina, la proteína C de unión a la miosina, entre otras. La titina, también denominada conectina (Wang, 2001), es de vital importancia para la estructura, función y elasticidad del sarcómero. Esta es un monómero alargado y flexible que participa principalmente en la tensión pasiva del sarcómero, entendiéndose a ésta como la tensión ejercida por el sarcómero en respuesta al estiramiento (diferente a la fuerza activa proveniente de la interacción actina/miosina con consumo de ATP). Esta proteína de 3000 KDa une los extremos de miosina con los discos Z (ver figura 9).

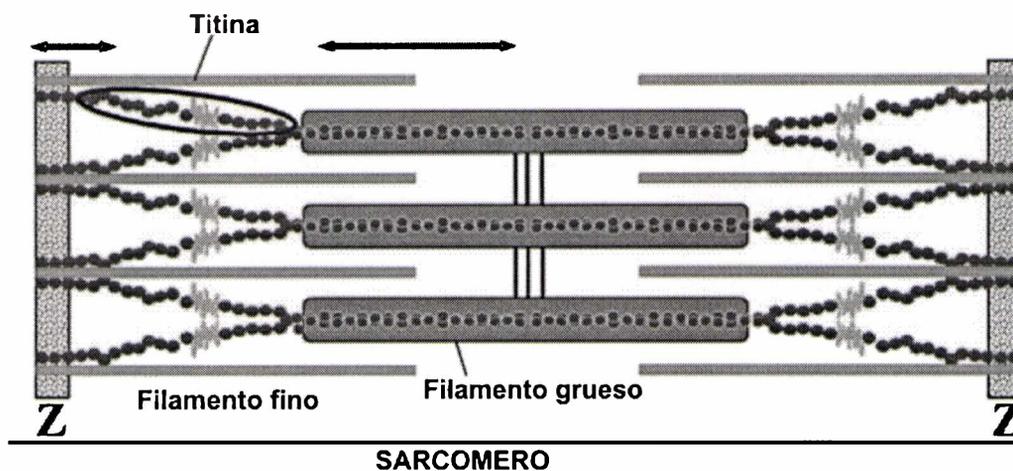


Figura 9. Esquema del sarcómero mostrando los filamentos principales. Esta figura muestra los dos filamentos principales (el fino de actina y el grueso de miosina) y la titina, el tercer filamento. Nótese que hay dos filamentos de titina por cada mitad de miosina, en realidad son seis filamentos de titina desde el disco Z por cada mitad de miosina (Granzier, 1995). (Modificado de Granzier, 2007).

1.5 El núcleo

El núcleo ocupa alrededor del 10% del total del volumen celular. Este compartimiento está limitado por dos bicapas lipídicas que son atravesadas por poros nucleares los cuales transportan moléculas desde el interior hacia el citoplasma. Contenido en el núcleo se encuentra casi toda la totalidad del ADN de cada célula junto a sus proteínas estructurales. Esta compartimentalización permite separar las enzimas nucleares de las citoplasmáticas (Alberts, 2002).

Un rasgo distintivo de los miocitos cardíacos adultos es la presencia de dos núcleos separados. Después del nacimiento de los miocitos, estos pierden la capacidad de dividirse. La síntesis de ADN está asociada con la proliferación durante la vida fetal y una segunda fase de síntesis de ADN está asociada con la binucleación en los primeros días de la vida neonatal (Woodcock, 2005).

Aunque el papel del núcleo es de suma importancia en diversos procesos fisiopatológicos cardíacos, la explicación detallada de la estructura del núcleo y su función escapa a los alcances de esta tesis.

Hasta ahora se han descrito las principales estructuras que conforman a la célula cardíaca, en la parte siguiente se describirán a estas estructuras interactuando y conformando el acoplamiento excito-contráctil.

2. ACOPLAMIENTO ÉXCITO-CONTRÁCTIL EN EL CORAZÓN NORMAL

La contracción de cada célula del músculo cardíaco o miocito, es consecuencia de un conjunto de fenómenos que comienzan en la membrana celular o sarcolema, con la despolarización de la misma (potencial de acción), y culminan en el interior de la célula con la contracción a nivel de los miofilamentos. Este proceso que tiene como nexos principales al ión Ca^{2+} , se denomina acoplamiento excito-contráctil (AEC). El ciclo se completa con los procesos que llevan a la relajación.

Luego de un estímulo, la membrana celular se despolariza por la entrada de Na^+ . A partir de los -40 mV, se abren los canales lentos de Ca^{2+} (de tipo L) y el Ca^{2+} entra a la célula a través de los mismos, originando la corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}), predominante en la meseta del potencial de acción. La entrada de Ca^{2+} libera una mayor cantidad de Ca^{2+} del RS a través de sus canales de liberación de Ca^{2+} o RyR2 (liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}) suministrando el Ca^{2+} necesario para la contracción (Fabiato, 1975).

Este proceso ocurre muy eficazmente debido a la colocalización de los DHPR y los RyR2 en el microdominio entre el RS y la membrana sarcolemal. Experimentos realizados mediante microscopía confocal demuestran que el Ca^{2+} es liberado en "cuantos" que se denominan "chispas" más conocidas por su nombre en inglés "sparks" a partir de un grupo de canales de RyR2. Aunque las "sparks" de Ca^{2+} ocurren estocásticamente durante la diástole a muy baja

frecuencia y sin I_{Ca} que las dispare, varios miles de sparks pueden ser sincronizadas por la I_{Ca} durante la despolarización y el Ca^{2+} liberado se suma temporal y espacialmente, para dar lugar al aumento de Ca^{2+} citosólico global (transitorio de Ca^{2+}) (para rev. ver Cheng, 1996) (figura 10). Este aumento de Ca^{2+} citosólico inicia una serie de procesos que desencadenan la contracción por fijación del ión a las proteínas contráctiles (figura 11).

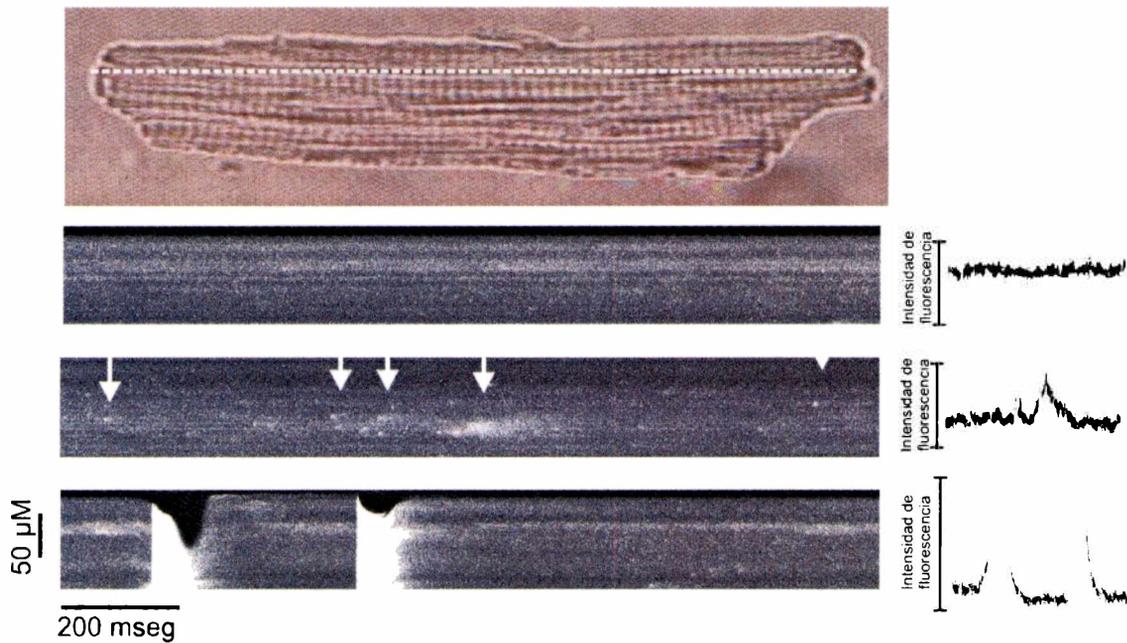


Figura 10: *Medidas confocales de chispas de Ca^{2+} y Ca^{2+} intracelular.* Las imágenes se obtuvieron realizando un escaneo en línea (line scan) a lo largo del eje longitudinal del miocito (línea punteada blanca). El panel superior y el del medio muestran dos escaneos sucesivos en los que no se aplicó un estímulo eléctrico. Se puede observar que en la imagen superior no se registraron cambios en la fluorescencia en tanto que en la imagen del medio se registraron algunos eventos espontáneos (chispas), que son provocados por la liberación espontánea de Ca^{2+} por un canal de rianodina. Estas chispas son de menor amplitud que los transitorios de Ca^{2+} , que se observan en el panel inferior, provocados por la estimulación eléctrica de la célula.

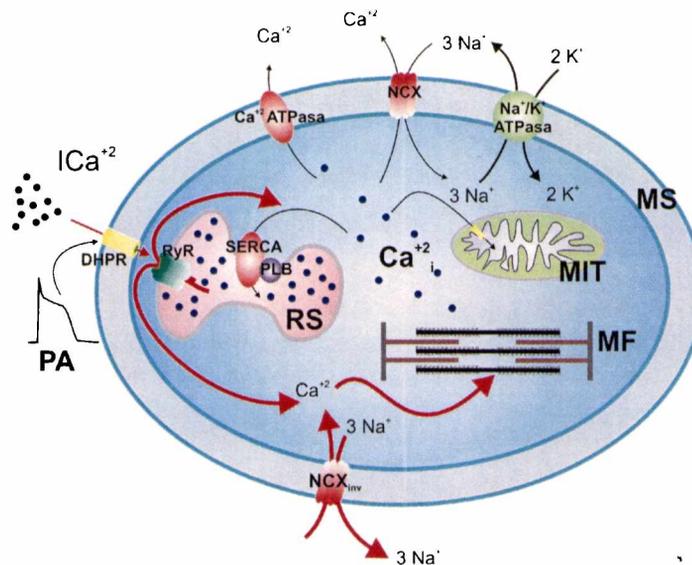


Figura 11. Esquema de las posibles fuentes de aumento del Ca^{2+}_i y fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} : Con flechas rojas se indican las principales vías de entrada de Ca^{2+} al citosol, a través de los canales tipo L (DHPR), desde el RS a través de los RyR2, o a través del NCX_{inv} . Los canales de Ca^{2+} tipo L se encuentran próximos a los de RyR2. En respuesta al cambio del potencial de la membrana sarcoplásmica (MS) por la llegada del potencial de acción (PA), se activa una corriente de Ca^{2+} tipo L (I_{Ca}) y se genera un pulso de Ca^{2+} que activa a los RyR2 en el retículo sarcoplásmico (RS), produciendo liberación de más Ca^{2+}

Según la teoría del deslizamiento de los filamentos, el acortamiento del músculo estriado se produce debido al deslizamiento de los filamentos finos sobre los gruesos hacia el centro del sarcómero provocando que cada uno de los sarcómeros se acorte sin que se modifique la longitud de los miofilamentos. La base molecular de la contracción muscular se debe a la interacción cíclica de la actina con las cabezas de miosina (puentes cruzados) asociada a la hidrólisis de ATP (Ruegg, 1998). El deslizamiento de los filamentos y su consecuencia, la contracción muscular, están regulados por la troponina y la tropomiosina. Estas dos proteínas actúan como inhibidores naturales de la interacción entre actina y miosina.

Para que desaparezca la inhibición y se inicie la contracción es necesaria la presencia de Ca^{2+} . Cuando la concentración de Ca^{2+} es baja, en el músculo en reposo, el complejo tropomiosina-troponina bloquea la interacción entre los miofilamentos ya que cubre el sitio activo de la actina. Cuando aumenta la $[Ca^{2+}]$ se revierte la inhibición preexistente y se desencadena la contracción muscular. El Ca^{2+} se une a la TnC y se produce un cambio en el complejo

tropomiosina-troponina que hace que se libere el bloqueo del sitio activo de la actina y de esta forma puedan interactuar la actina y la miosina; esta interacción produce la activación de la ATPasa de la miosina, lo que produce la hidrólisis de ATP y la liberación del fosfato de alta energía (P_i) del ATP. Esta liberación provoca una unión fuerte entre la actina y la miosina, provocando el deslizamiento del filamento fino sobre el grueso, produciendo el acortamiento muscular (figura 12).

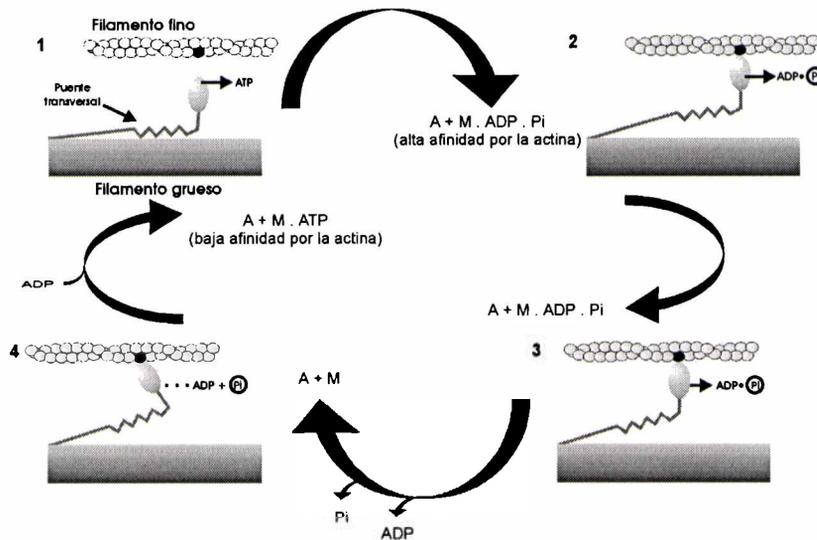


Figura 12. *Procesos bioquímicos durante un ciclo de contracción.* El puente transversal se une al filamento fino girando sobre sí mismo y generando tensión tracciona del filamento fino, que se desliza sobre el grueso; luego la cabeza de miosina se libera para volver a fijarse en otro punto del filamento de actina, y así sucesivamente. Los puentes transversales de las mitades opuestas del sarcómero giran en direcciones opuestas y de esta forma acercan cada mitad del sarcómero al centro. La energía para la contracción proviene de la hidrólisis de ATP en ADP y P_i . El ATP se une a la cabeza de miosina inhibiendo la unión de ésta con la actina (1). La baja actividad ATPasa de la miosina hace que el ATP sea desdoblado lentamente en ADP y P_i formando un complejo intermedio, miosina-ADP- P_i (2). Este complejo es capaz de unirse a la actina formando el complejo activo, actina-miosina-ADP- P_i (3). Esta nueva interacción formada promueve la actividad ATPasa de la miosina haciendo que se libere el fosfato de alta energía del ATP, determinando un cambio en la posición del puente transversal y el deslizamiento del filamento fino sobre el grueso (4). De esta manera la energía química es transformada en mecánica. El nuevo estado (4) se conoce como complejo de rigor y permanece así hasta que una nueva molécula de ATP se una a la cabeza de miosina. (Modificado de Cingolani HE, Houssay AB y colaboradores. *Fisiología Humana de Houssay. Sección I. Fisiología General* (ed) El Ateneo 2000, pp 59-94, Buenos Aires).

2.1 Relajación miocárdica.

Para que el músculo se relaje es necesario que baje la $[Ca^{2+}]_i$, permitiendo que este se disocie de la TnC. Cuatro sistemas están involucrados en la remoción del Ca^{2+} citoplasmático durante la relajación: La SERCA2a, el NCX, el transportador de Ca^{2+} mitocondrial y la ATPasa sarcolemal (figura 13). La proporción en que cada uno de ellos contribuye al descenso del Ca^{2+} citosólico varía según la especie y las condiciones fisiopatológicas (Bers, 2006). El principal responsable de la relajación muscular es el RS ya que posee en la membrana a la SERCA2a, que produce el transporte de Ca^{2+} desde el citosol hacia el RS (retoma de Ca^{2+}) a una velocidad suficiente como para producir la relajación; como se mencionó previamente esta velocidad esta regulada por el estado de fosforilación de PLN.

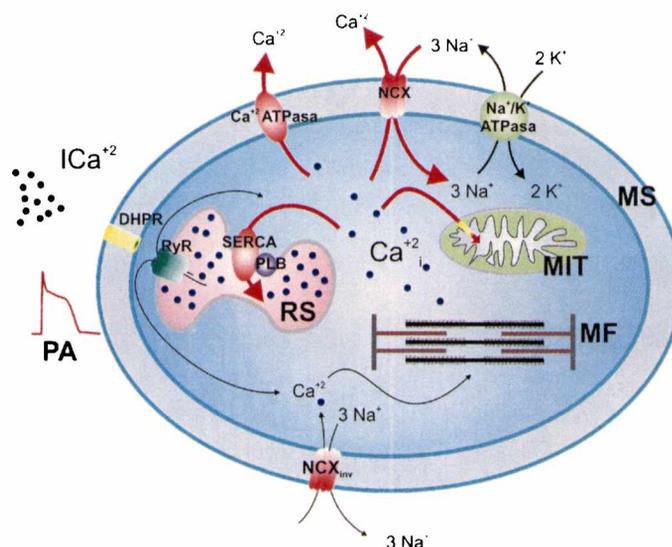


Figura 13. Representación esquemática de las vías de eliminación del Ca^{2+} citosólico. Luego de la contracción el complejo troponina-tropomiosina libera Ca^{2+} porque la concentración citosólica disminuye. Con flechas rojas se muestran las principales vías de eliminación de Ca^{2+} . Éstas son a través de la SERCA2a, el modo directo del NCX, la Ca^{2+} ATPasa del sarcolema y el transportador de Ca^{2+} de las mitocondrias.

En el ventrículo de conejo la SERCA2a remueve el 70% del Ca^{2+} responsable de la contracción, el NCX remueve el 28% dejando sólo el 2% para el transportador mitocondrial y la ATPasa sarcolemal (conocidas como rutas de extrusión de Ca^{2+} lentas). En ventrículo de rata, la actividad de la SERCA2a es mayor, remueve el 92% del Ca^{2+} y el 7% es removido a través del NCX. En ventrículo de ratón, la remoción de Ca^{2+} es similar a la rata, mientras que en el

ventrículo de perro, gato, cobayo y humano es más parecida al conejo (Bers, 1996).

2.2 Modulación de la contractilidad

En el músculo cardíaco la fuerza contráctil puede ser modulada a nivel subcelular por dos mecanismos básicos, no excluyentes el uno del otro. Estos son: 1) un cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ y/o 2) una modificación en la respuesta de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} . Esta última modificación podría deberse a un aumento o disminución en la sensibilidad al Ca^{2+} a nivel de las proteínas regulatorias de los filamentos finos (específicamente TnC, y/o un aumento o disminución de la fuerza máxima, a nivel de los puentes transversales en los filamentos gruesos.

1) Los aumentos de Ca^{2+} citoplasmático se traducen en un aumento de la fuerza de acuerdo con la relación fuerza- Ca^{2+} . Los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ (transitorio de Ca^{2+}) tales como los que producen diferentes intervenciones inotrópicas positivas (aumentos del Ca^{2+} extracelular, glucósidos cardiotónicos), desplazan la fuerza a lo largo de la curva fuerza- Ca^{2+} correspondiente. Este cambio en la capacidad del sarcómero para realizar fuerza o acortarse se debe al ascenso del Ca^{2+} intracelular que aumenta la cantidad de Ca^{2+} unido a la TnC y, por lo tanto, la capacidad de ejercer fuerza (Yue, 1986; Solaro, 1998).

2) Los aumentos en la sensibilidad al Ca^{2+} se reflejan en desplazamientos paralelos hacia la izquierda de la relación fuerza- Ca^{2+} lo que se traduce en una mayor fuerza a una dada $[Ca^{2+}]_i$ o a una menor $[Ca^{2+}]_i$ para lograr una fuerza dada. El mecanismo básico por el cual cambia la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos es una modificación en la afinidad de la TnC por el Ca^{2+} (el-Saleh, 1986). Esta afinidad está determinada por la velocidad de asociación y disociación entre el Ca^{2+} y la TnC. Entonces, si disminuye la velocidad con la que el Ca^{2+} se disocia de la TnC, el Ca^{2+} quedará unido por más tiempo, a la misma, lo que resulta en un aumento de la fuerza para esa $[Ca^{2+}]_i$. Este fenómeno no afecta directamente los puentes cruzados y por lo tanto no hay efectos sobre la fuerza máxima.

Las alteraciones en la fuerza máxima pueden deberse a un cambio en la disponibilidad de los puentes cruzados, en el número de puentes cruzados unidos fuertemente a la actina o en la fuerza que puede realizar cada uno de

los puentes (Lee, 1993). Generalmente en las intervenciones que producen una alteración en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles es difícil diferenciar si esta alteración se debe a cambios en la sensibilidad o en la fuerza máxima, ya que por un lado, la mayoría de las intervenciones que modifican la sensibilidad frecuentemente alteran también la fuerza máxima, y por otro, las modificaciones de la fuerza máxima son de difícil comprobación en preparaciones intactas.

Dentro de las situaciones que afectan la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos se pueden nombrar a los cambios de la longitud inicial (Allen, 1985), la acidosis (Fabiato, 1978), la fosforilación de las cadenas livianas de miosina (Morano, 1988) y la estimulación α y β adrenérgicas (Endoh, 1988).

2.2.1 Mecanismos fisiológicos que regulan la contractilidad

a) Relación fuerza-longitud

Las células musculares son capaces de aumentar su capacidad de ejercer fuerza a medida que se las estira, es decir, a medida que aumenta su longitud inicial. En el corazón intacto se conoce a este mecanismo como Ley de Frank-Starling y es de vital importancia en la regulación de la fuerza latido a latido. Este mecanismo es un buen ejemplo de una intervención por la que se eleva la capacidad del músculo para realizar fuerza por todos los mecanismos arriba descritos. El aumento de la longitud inicial de la fibra provoca un incremento inmediato de la respuesta al Ca^{2+} debido principalmente a un aumento de la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos, producido por una mayor afinidad de la TnC por el Ca^{2+} . Tiene lugar además un aumento de la fuerza máxima, que puede atribuirse a un incremento del número de puentes transversales con posibilidad de interactuar con los sitios activos de actina. Al aumento de fuerza que ocurre inmediatamente después del estiramiento le sigue un aumento de la fuerza que ocurre lentamente y que es producido por un ascenso en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} (Alvarez, 1999).

b) Estimulación β -adrenérgica

La estimulación β -adrenérgica es la vía fisiológica por la que el sistema nervioso simpático regula el estado inotrópico (contractilidad) y lusitrópico (relajación) del corazón. Los receptores adrenérgicos más importantes en el

corazón son el $\beta 1$ y el $\beta 2$, siendo el $\beta 1$ el 75-80% del total (Dohlman, 1991). Los receptores β -adrenérgicos están uniformemente distribuidos en el miocardio con densidades similares en tejido auricular y ventricular y son parte de la familia de receptores acoplados a proteína G. En particular los agonistas β inician una cascada que activa a la proteína G_s , la cual estimula a la adenil ciclasa para producir AMP cíclico (AMPc). El AMPc activa a PKA. Esta quinasa fosforila numerosas proteínas relacionadas con el AEC (PLN, canales de Ca^{2+} tipo L, RyR2, troponina I y la proteína C) (Bers 2000).

El efecto inotrópico de la estimulación β -adrenérgica es debido a la combinación de dos fenómenos, por un lado un aumento de la I_{Ca} fundamentalmente por fosforilación por PKA del canal de Ca^{2+} y por otro, el aumento de la carga del RS debido a la fosforilación de PLN, que combinados aumentan la amplitud del transitorio de Ca^{2+} .

El efecto relajante o lusitrópico también está mediado por la fosforilación de PLN y de la troponina I por PKA y CaMKII, aumentando la velocidad de retoma de Ca^{2+} por el RS y la disociación del Ca^{2+} de los miofilamentos respectivamente.

La fosforilación de PLN por estimulación β -adrenérgica ocurre en el sitio Ser¹⁶ por PKA. Además el Ca^{2+} aumentado como consecuencia de las fosforilaciones de PKA, se une a la calmodulina y activa a la CaMKII lo que determina la fosforilación de PLN a nivel del residuo Thr¹⁷ (Mundiña-Weilenmann, 1996).

El papel de la fosforilación de los RyR2 por estimulación β -adrenérgica es discutido. Trabajos recientes indican que la estimulación β -adrenérgica fosforila el sitio Ser 2809 y 2830 por PKA y el sitio Ser 2815 por CaMKII. Esta última fosforilación parece ser importante en el aumento de la velocidad de liberación de Ca^{2+} por el RS (Ferrero, 2007).

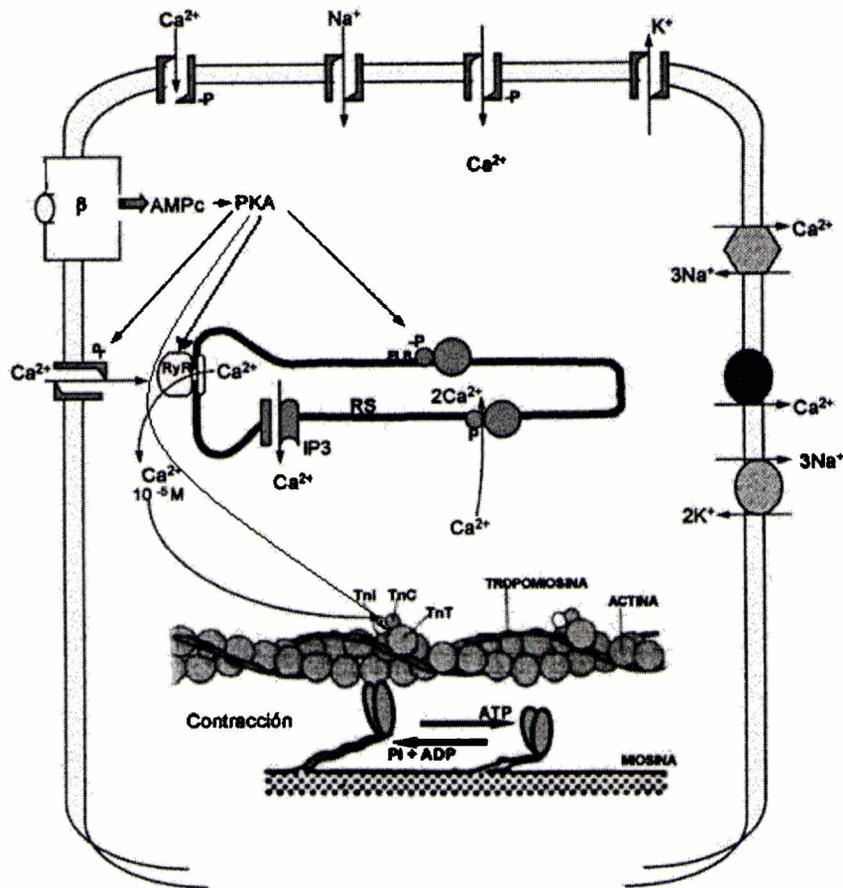


Figura 14. Representación esquemática del efecto de la estimulación β adrenérgica sobre la AEC. La estimulación de los receptores β por agonistas activa a la proteína G y esta estimula a la adenil ciclasa para producir AMPc. El AMPc activa a PKA y esta fosforila a PLN, canales de Ca^{2+} tipo L, RyR2, troponina I.

c) Relación fuerza-frecuencia

Este mecanismo juega un rol esencial en el ajuste de la función del corazón, permitiéndole a la bomba cardíaca responder a las diferentes necesidades hemodinámicas del cuerpo. Este mecanismo también denominado escalera positiva, se describe como un aumento de la fuerza de contracción asociada a un aumento de la frecuencia de estimulación y se encuentra preservado en un amplio rango de especies incluidas, entre ellas, la humana (Endoh, 2004). Aunque generalmente se habla de relación fuerza-frecuencia, ya que la descripción del fenómeno de la escalera se realizó inicialmente midiendo la fuerza isométrica realizada por el músculo cardíaco (Bowditch, 1871;

Woodworth, 1902), el fenómeno de la escalera positiva también puede observarse cuando se estudia al músculo cardíaco o al miocito aislado contrayéndose en forma isotónica (acortándose). Al aumento en la magnitud del acortamiento al aumentar la frecuencia, lo denominaremos relación acortamiento-frecuencia y nos referiremos a este término en lo que sigue de la tesis. El incremento en la fuerza de contracción está asociado con un incremento en la amplitud del transiente de Ca^{2+} (figura 15), que se debe a una mayor carga y liberación de Ca^{2+} por el RS (Bers, 2001). A su vez, este aumento en la carga del RS se debería a: 1) un aumento en la entrada de Ca^{2+} a la células a través de los canales de Ca^{2+} tipo L, como resultado del aumento del número de despolarizaciones por unidad de tiempo (Para rev. ver Endoh, 2006) y 2) un aumento del Ca^{2+} diastólico. Experimentos de nuestro laboratorio han demostrado que este aumento estaría fundamentalmente determinado porque el incremento en la frecuencia de estimulación, al reducir el intervalo diastólico, impediría que el NCX tuviera tiempo suficiente como para extruir el Ca^{2+} que entra a la célula en cada latido (Vila Petroff, 2003).

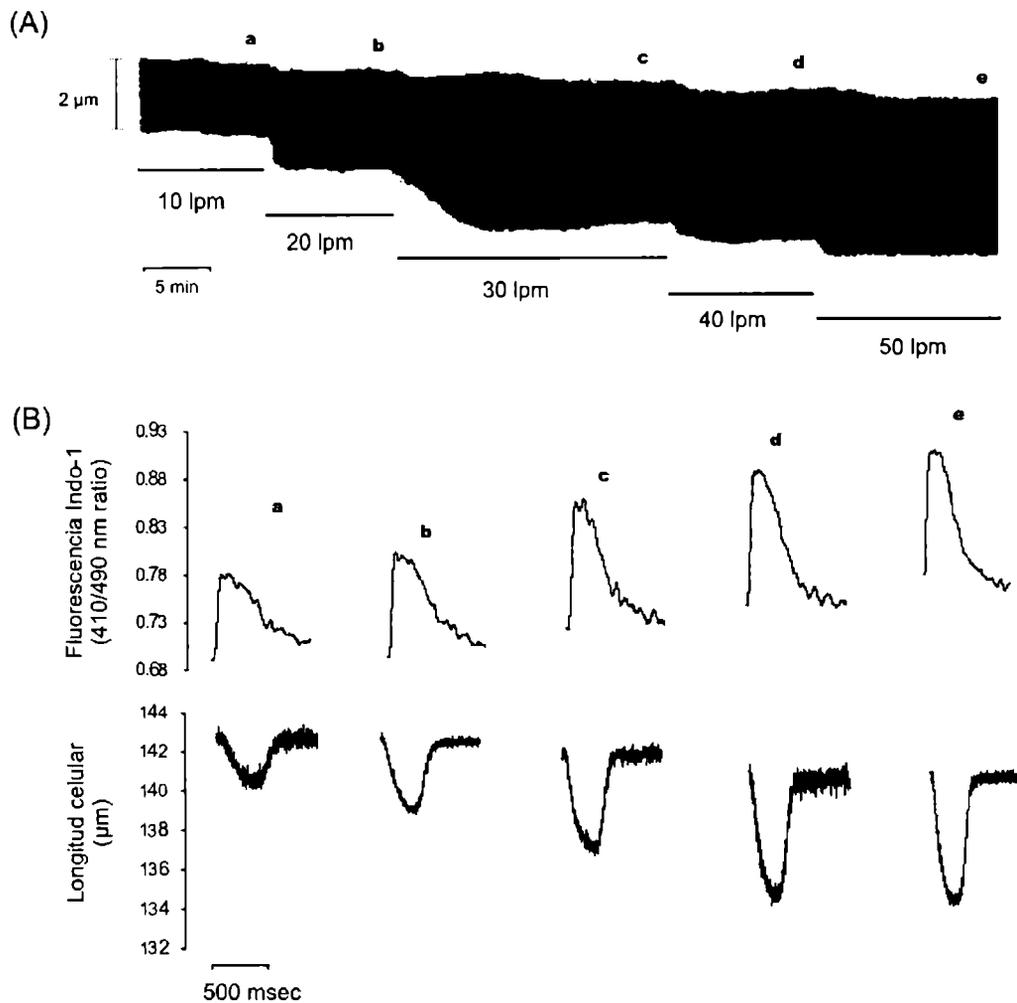


Figura 15. El aumento de la frecuencia de estimulación está asociado con un aumento del transitorio de Ca^{2+} . (A) registro continuo típico del cambio de acortamiento celular producido por el aumento en la frecuencia de estimulación. Este aumento en la frecuencia de estimulación provoca un aumento en la amplitud de la contracción (latidos por minuto-lpm). (B) Trazos de contracciones individuales (Long. celular) y de los transitorios de Ca^{2+} (fluorescencia Indo-1) asociados a las frecuencias indicadas por las letras a-e. El incremento en la frecuencia de estimulación de 10 a 50 lpm está asociado a incremento en la amplitud de la contracción y del transitorio de Ca^{2+} (modificado de Vila Petroff, 2003).

3. DISFUNCIÓN CONTRÁCTIL EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

En la actualidad, es bien conocido que la disfunción contráctil que exhiben los corazones insuficientes es en parte debida a una alteración en el manejo del Ca^{2+} intracelular. Pero también, evidencia experimental reciente indica que la pérdida de unidades contráctiles por un proceso altamente regulado denominado muerte celular programada o apoptosis, podría jugar un papel importante en la progresión a la insuficiencia cardíaca y en el deterioro de la función contráctil observada en el curso de esta entidad patológica. Muchos estudios han demostrado que la inhibición de la apoptosis previene el desarrollo de IC (para rev. Ver Lee, 2009). En lo que sigue en esta tesis, se describirán por un lado las alteraciones en el manejo del Ca^{2+} , que llevan a las alteraciones del AEC y por otro lado las posibles causas que llevan a la activación de la muerte celular programada o apoptosis, ya que ambas entidades contribuyen a la disfunción contráctil del corazón insuficiente.

3.1 Alteraciones del AEC

Actualmente es bien aceptado que el déficit en la contractilidad observado en la IC es en parte debido a una disminución del transitorio de Ca^{2+} (Pieske, 2002) (Ver figura 16). Esta disminución en el transitorio de Ca^{2+} estaría dada por un manejo anormal del Ca^{2+} que llevaría a una menor carga del RS con una menor liberación del ión por los RyR2 y la consecuente disminución en la contractilidad.

A continuación se revisarán cuáles estructuras del AEC se encuentran alteradas en la IC y podrían ser responsables de las alteraciones en el manejo del Ca^{2+} y por ende de la disfunción contráctil observada en esta entidad patológica.

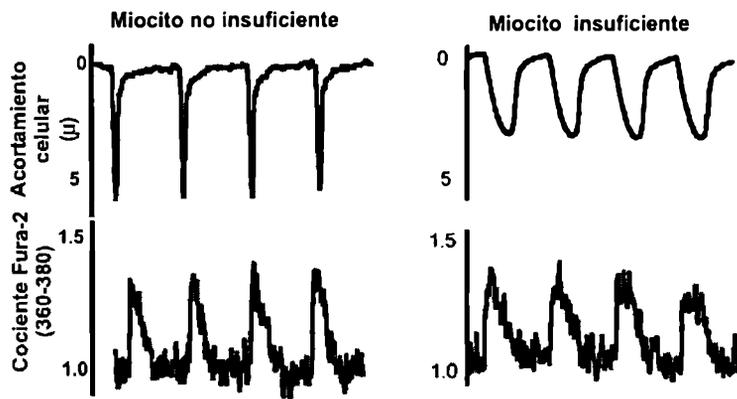


Figura 16. Alteración de la contracción y del transitorio de Ca^{2+} en un miocito insuficiente. Registro de la contracción y del Ca^{2+} , en un miocito insuficiente que muestra una menor amplitud de la contracción y un transitorio de Ca^{2+} menor y prolongado. (Modificado de del Monte, 1999).

3.1.1 Canales de Ca^{2+} tipo L

La mayoría de los estudios en IC han descrito que la densidad de los canales de Ca^{2+} tipo L no está consistentemente alterada (para rev. ver: Hasenfuss, 1998), así como tampoco se han descrito modificaciones en la I_{Ca} (Gomez, 1997; O'Rourke, 1999; Bers, 2006), lo que sugeriría que una alteración de la misma no tendría un papel fundamental en la disminución del Ca^{2+} intracelular observado en esta patología.

3.1.2 SERCA2a

Si bien existen trabajos en corazones insuficientes donde no se ha observado una alteración en la expresión de la SERCA2a (Ai, 2005; Weisser-Thomas, 2005; Schwinger, 1995), la mayoría de los trabajos en IC postulan que existe una disminución en la expresión de la SERCA2a (Arai, 1994; Meyer, 1995; Muller, 2003; Prunier, 2005) que se acompaña en muchos modelos de una menor expresión de PLN de manera proporcional a la disminución de la SERCA2a (la disminución proporcional de ambas proteínas no alteraría la afinidad de la bomba de Ca^{2+} por el Ca^{2+} , pero sí disminuiría la capacidad total de transporte de Ca^{2+} del RS) (Mercadier, 1990; Bers, 2006). Esto llevaría a una disminución en la capacidad de transporte de Ca^{2+} por el RS, con dos consecuencias fundamentales: una disminución de la velocidad de relajación y una menor carga del RS y por lo tanto en la liberación del mismo ión por el RS.

Esto resulta, en una menor activación de las proteínas contráctiles y por ende, en una menor contractilidad.

3.1.3 NCX

Aunque existen resultados controversiales con respecto a si el NCX se encuentra alterado en la IC, en la mayoría de los modelos de IC se describe un aumento del eflujo de Ca^{2+} a través del NCX. Se han encontrado aumentados tanto los niveles de ARNm (Pogwizd, 1994) como los niveles de proteína del NCX (Bers, 2006; Hobai, 2004; Schillinger, 2000). El NCX está involucrado en la extrusión de Ca^{2+} de la célula (modo directo) durante la relajación. Este aumento en la expresión podría estar compensando la menor expresión/actividad de la SERCA2a. Esto llevaría a que el balance global del flujo de Ca^{2+} se incline a favor de una menor retoma de Ca^{2+} por el RS y por lo tanto en una menor carga del mismo (Bers, 2000). Se ha propuesto que este mecanismo podría ayudar a prevenir la sobrecarga de Ca^{2+} y la disfunción diastólica típica del corazón insuficiente (Hasenfuss, 1994). Sin embargo otros trabajos han sugerido que la sobreexpresión del NCX, aunque mejora la relajación, podría contribuir a la disfunción contráctil del corazón insuficiente debido a que a su vez depleciona de Ca^{2+} al RS (Sipido, 2000; Hobai, 2004). Estos resultados aparentemente contradictorios indican que, hasta el presente, la contribución de la sobreexpresión del NCX al fenotipo contráctil de corazón insuficiente no ha sido enteramente dilucidada.

3.1.4 Regulación del Na^+ intracelular

La $[\text{Na}^+]_i$ está elevada en la IC (Despa, 2003; Pieske, 2002). Este aumento podría tener consecuencias importantes sobre el manejo del Ca^{2+} debido a su impacto sobre el funcionamiento del NCX. Existen dos posibles explicaciones para este aumento: 1) una disminución en la extrusión de Na^+ y/o 2) un incremento en el influjo de Na^+ . El Na^+ puede entrar a la célula a través de varias rutas, como por ejemplo a través del NCX actuando en modo directo, los canales de Na^+ y a través de mecanismos dependientes del pH, entre ellos el más relevante es el intercambiador Na^+/H^+ (NHE).

La bomba de Na^+ es la principal ruta de extrusión de Na^+ . Aunque el NCX puede extruir Na^+ de la célula trabajando en modo reverso, durante el ciclo

cardíaco hay un influjo neto de Na^+ a través del NCX trabajando en su modo directo (Pogwizd, 2003; Bers, 2006).

Con respecto a la bomba de Na^+ , en la mayoría de los modelos de IC se ha encontrado una disminución en la expresión de esta proteína (incluso en miocitos humanos provenientes de corazones insuficientes) (Shamraj, 1993; Schwinger, 1999), así como también cambios en las densidades relativas de las diferentes isoformas de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa (Pieske, 2003). Como se mencionó mas arriba, cada isoforma de la bomba (α_1 , α_2 y α_3) tiene diferente afinidad por el Na^+ . Los datos de los patrones de expresión de las diferentes isoformas de la bomba Na^+/K^+ ATPasa no son coincidentes entre los diferentes modelos. El grupo de Kim y colaboradores encontró en corazones insuficientes de perro ausencia de la isoforma α_2 y una disminución de los niveles α_3 (Kim, 1994). Schwinger y colaboradores describen una disminución en los niveles de α_1 y α_3 (Schwinger, 1999). Estos resultados dispares podrían deberse al tipo de especie utilizada, y/o al preparado utilizado para las mediciones, ya que en preparados de homogenato de corazón existe una gran cantidad de células que no son musculares que pueden no representar a la densidad de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa presente en los cardiomiocitos.

En resumen, ambas alteraciones (una disminución en la expresión o un cambio en los patrones de expresión de las diferentes isoformas de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa) contribuirían a una menor extrusión de Na^+ y por lo tanto al aumento del Na^+_i , como el que es descrito en la IC.

Con respecto a las rutas de entrada de Na^+ , hay fuertes evidencias y consenso general en que existe un aumento del influjo de Na^+ a través de la corriente rápida de Na^+ (I_{Na}) (Despa, 2002). Se han encontrado alteraciones en los canales de Na^+ en modelos de perros y humanos insuficientes, estos canales muestran una inactivación más lenta y por lo tanto una I_{Na} mas sostenida que lleva a un incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ (Undrovinas, 1999; Maltsev, 2007).

El grupo de Baartscheer y colaboradores atribuye el aumento de Na^+ al NHE, ya que el aumento en el Na^+ pudieron revertirlo usando un inhibidor del NHE, cariporide. Además describen un aumento en la expresión del NHE en cardiomiocitos de conejos insuficientes (Baartscheer, 2003). Sin embargo estos resultados son controversiales ya que la dosis usada de cariporide se ha visto que tiene efectos sobre la I_{Na} , inhibiéndola y de esta manera el efecto

beneficioso del cariporide sería también por disminuir la entrada de Na^+ a través de la I_{Na} (Chattou, 2000).

3.1.5 Alteraciones de la relación fuerza-frecuencia (acortamiento-frecuencia) en la IC

Una de las consecuencias más importantes de la alteración del AEC en la IC, es la alteración en la relación fuerza-frecuencia (fenómeno de la escalera) y ésta es una razón por la que el corazón insuficiente es incapaz de satisfacer los mínimos requerimientos metabólicos generados por el ejercicio moderado. En general dichas alteraciones se presentan en forma de una ausencia en el aumento de contractilidad en respuesta al aumento de la frecuencia de estimulación (escalera ausente) o en los casos más extremos, en una disminución de la contractilidad asociada a un aumento de la frecuencia de estimulación (relación fuerza-frecuencia o acortamiento-frecuencia invertida o escalera negativa) (Feldman, 1988; Rossman, 2004). La escalera negativa se ha encontrado experimentalmente tanto en preparaciones enteras como en miocitos aislados, y clínicamente, en estudios que revelan una reducción en la función cardíaca a medida que aumenta la frecuencia de estimulación (Mulieri, 1992; Hassenfuss, 1994).

En el corazón insuficiente, el aumento de la frecuencia de estimulación está asociado con una disminución del transitorio de Ca^{2+} (Piacentino, 2003).

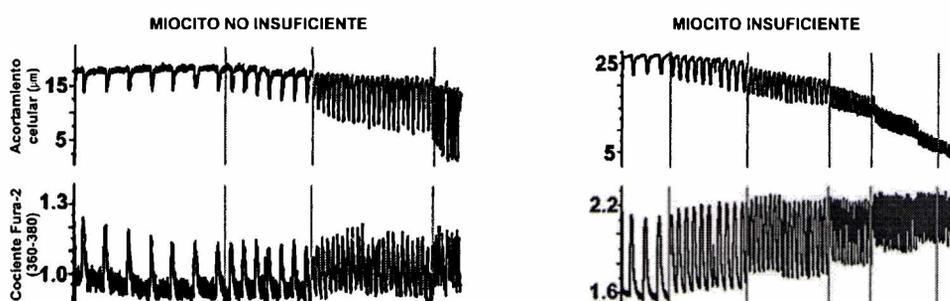


Figura 17. Escalera negativa en la insuficiencia cardíaca. Registros de acortamiento celular y transitorio de Ca^{2+} (medido con el indicador de Ca^{2+} fluorescente Fura-2) de miocitos provenientes de corazones humanos insuficientes y no insuficientes. En el miocito insuficiente se observa una disminución del acortamiento y un aumento del Ca^{2+} diastólico a medida que aumenta la frecuencia de estimulación (Modificado de del Monte, 1999).

El consenso general entre los distintos autores indica que esta disminución se debería principalmente a una alteración de la carga de Ca^{2+} del RS y en consecuencia en la liberación de Ca^{2+} por el mismo (Schillinger, 1998). En el corazón sano, la escalera positiva está acompañada por un aumento paralelo del contenido de Ca^{2+} del RS. En cambio en el corazón insuficiente, el contenido de Ca^{2+} del RS no cambia con el aumento de la frecuencia de estimulación, en tanto que la fuerza desarrollada disminuye (Endoh, 2004; Maier, 2005). Estos estudios sugieren que la escalera negativa observada en la IC sería mediada por una alteración en el manejo del Ca^{2+} . En la figura 17 se puede observar que en tanto que en el miocito sano el aumento de la frecuencia de estimulación cursa con un aumento en el transitorio de Ca^{2+} , en el miocito insuficiente se observa una disminución del transitorio de Ca^{2+} y un aumento del Ca^{2+} diastólico con el aumento de la frecuencia de estimulación. Como se mencionó previamente una disminución en la expresión y/o actividad de la SERCA2a (Arai, 1994; Schwinger, 1995) y un incremento en la expresión del NCX (Flesch, 1996) podrían ser las principales modificaciones responsables de las alteraciones del manejo del Ca^{2+} y de la escalera negativa en la IC. Estas alteraciones podrían cambiar el balance del flujo de Ca^{2+} durante la relajación, favoreciendo la extrusión de Ca^{2+} a través del NCX y disminuyendo la retoma de Ca^{2+} por el RS, lo que resultaría en una menor carga y liberación de Ca^{2+} por el mismo, y en consecuencia en una menor activación de las proteínas contráctiles en el corazón insuficiente. Además, los elevados niveles basales de Na^+ presentes en la IC podrían favorecer el influjo de Ca^{2+} o disminuir el eflujo de Ca^{2+} a través del NCX. El incremento en el Ca^{2+} citosólico podría ayudar a preservar la contractilidad a bajas frecuencias de estimulación. Sin embargo, este mecanismo llevaría a que el RS se encuentre relativamente lleno a bajas frecuencias de estimulación y conspiraría así contra un aumento en la carga del mismo a altas frecuencias de estimulación. El Ca^{2+} citosólico podría no ser fácilmente removido por el RS debido a la disminución en la expresión y/o actividad de la SERCA2a y por lo tanto la función sistólica y diastólica estarían desmejoradas.

Es importante señalar en este punto que existen numerosos estudios que han investigado y se han focalizado en el rol de cada componente del AEC en la generación de la escalera negativa característica de la IC. Entre ellos están los

que describen una función alterada de la SERCA2a (Davia, 1997; del Monte, 1999; Muller, 2003), los que describen un aumento de la expresión/actividad del NCX (Schillinger, 2000; Hobai, 2004;) o los que se centran en el aumento de los niveles de Na^+ (Mubagwa, 1997; Gray, 2001; Mills, 2006) como los principales determinantes de la escalera negativa o plana. Pero, por otro lado, existen trabajos que demuestran que en corazones insuficientes que poseen escalera negativa, la abundancia del NCX y de la SERCA2a no está consistentemente alterada (Ai, 2005; Weisser-Thomas, 2005). Además, en corazones no insuficientes de pequeños mamíferos la escalera negativa está presente aún con una actividad robusta de la SERCA2a (Bassani, 1994).

Estos resultados sugieren, que la alteración de un solo componente, no es suficiente para producir la escalera negativa característica de la IC, sino que, indicaría un escenario más complejo en el cual varios mecanismos actuando simultáneamente serían necesarios para producir la escalera negativa.

Examinar los mecanismos responsables de la escalera negativa será el primer objetivo de esta tesis.

3.2 Muerte celular en la IC

La disfunción contráctil que se observa en el corazón insuficiente, como ya se había mencionado, no sólo es debida a alteraciones en el manejo de Ca^{2+} sino que también puede deberse, al menos en parte, a la pérdida de unidades contráctiles, es decir, a la muerte de los cardiomiocitos.

La muerte celular puede deberse a dos grandes mecanismos: 1) Muerte celular programada o apoptosis y 2) Necrosis. Aunque recientemente se ha puesto en duda el concepto de que los miocitos mueren principalmente por apoptosis y/o necrosis y se está comenzando a estudiar a la autofagia como otra posible forma de muerte celular, los resultados hasta el momento son controvertidos, ya que la muerte por autofagia es más una definición morfológica y no hay evidencia de que sea un mecanismo específico de muerte celular (para ver Aranguiz, 2006). Recientemente se ha reconocido, que esta pérdida de unidades contráctiles juega un papel importante en la progresión a la IC (Gill, 2002; Ling, 2009) (para ver Lee, 2009). Aunque los niveles de apoptosis detectados en individuos en el último estadio de IC son muy bajos (para rev.

ver: Kang, 2000), aunque significativos, la pérdida de miocitos gradual y en el tiempo, podrían ser de gran relevancia en la progresión hacia la IC. Para poder comprender esto, hay que entender a la apoptosis como un mecanismo que tarda apenas unas horas para completarse (aproximadamente 24 hs) en tanto que la IC es un mecanismo que lleva varios años. El momento de extracción de la muestra es solo un punto en el tiempo en esta entidad patológica (van Empel, 2005).

A continuación se describirán los dos grandes mecanismos de muerte celular, la apoptosis y la necrosis, ya que las diferencias que exhiben estos dos mecanismos de muerte celular son claras y permiten establecer diferencias.

3.2.1 Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo conservado en la evolución que le permite a los organismos multicelulares descartar selectivamente a las células envejecidas o que son genéticamente inestables y pueden ser potencialmente peligrosas para el organismo. También es un fenómeno que se da con mucha frecuencia en la embriogénesis para desechar células funcionalmente anormales o innecesarias. Este mecanismo de muerte celular se caracteriza por una serie de cambios morfológicos típicos, tales como encogimiento celular, condensación de la cromatina, degradación del ADN en fragmentos regulares, fragmentación celular sin pérdida de la membrana plasmática y con formación de cuerpos "apotóticos", y en el caso de ser un modelo "in vivo" inmediata fagocitosis para evitar procesos inflamatorios. (Wyllie, 1995; Regula, 2005).

Es importante destacar que la apoptosis es un proceso fisiológico, altamente regulado y controlado, que involucra una serie de eventos programados genéticamente, que pueden ser desatados a partir de la influencia de factores regulatorios intra y extracelulares. La ausencia o la alteración de alguno de estos factores regulatorios contribuyen al desarrollo de diferentes patologías, ya sea porque el programa de muerte celular no se ejecuta y se acumulan células inestables genéticamente que pueden transformarse en clones inmortales (por ej. Cáncer) o porque el programa de muerte celular se gatilla inadecuadamente (por ej. Desórdenes neurodegenerativos, diabetes tipo I e insuficiencia cardíaca, entre otras patologías) (van Empel, 2005).

La apoptosis puede iniciarse a través de dos vías de señalización diferentes pero convergentes (ver figura 19). La vía extrínseca se inicia por la unión de ligandos a los llamados receptores de la muerte. Pertenecen a esta familia los receptores que unen al factor de necrosis tumoral (TNF-R1 y TNF-R2) y también Fas (Fas-CD95). Estos receptores son proteínas simples de transmembrana que poseen sitios de unión al ligando ricos en cisteína en la cara extracelular. La unión del ligando provoca la agregación de los receptores y el reclutamiento de otras proteínas, entre ellas la familia de las caspasas. Estas son un grupo de cisteína proteasas con elevada homología de función y estructura entre ellas. Todas ellas se sintetizan como proenzimas que se activan por proteólisis y tienen especificidad de corte en el sustrato, siempre después del residuo aspártico (Patel, 1996); podemos nombrar entre otras, la caspasa-2 y caspasa-8. En este complejo multiprotéico, caspasa-8 se vuelve activa y desencadena la activación de las denominadas caspasas efectoras terminales (caspasa-3, 6 y 7) responsables del clivado de sustratos intracelulares necesarios para la estructura, función metabólica y supervivencia celular. La vía intrínseca de apoptosis es mediada por las mitocondrias y deviene de una alteración de las mismas, con pérdida del potencial de membrana mitocondrial $\Delta\psi_m$ y con la consecuente apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP). La pérdida del $\Delta\psi_m$ provoca la liberación del citocromo c de la membrana mitocondrial (el citocromo c transfiere electrones del complejo III al IV en la cadena transportadora de electrones mitocondrial). El citocromo c liberado en presencia de desoxi-ATP o ATP, forma un complejo con la caspasa-9 y otras proteínas denominado apoptosoma, que activa otras caspasas corriente abajo para producir las alteraciones bioquímicas finales, como ser, la fragmentación del ADN, la exposición del fosfolípido fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular y la formación de los cuerpos apoptóticos (Regula, 2005). Esta vía se encuentra regulada por un grupo de proteínas anti-apoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-X_L y proteínas pro-apoptóticas tales como Bax y Bak, entre otras (Crow, 2004). La relación o balance entre las proteínas pro-apoptóticas y anti apoptóticas (Bax/Bcl-2) es indicativa de la propensión al desarrollo de la apoptosis en los miocitos (ver figura 20).

Existen también, otras proteínas involucradas en la muerte celular, como Smac y DIABLO que en condiciones normales, sin estímulos apoptóticos, se encuentran en la matriz mitocondrial, pero su liberación al citosol celular por diferentes agentes, induce apoptosis (Verhagen, 2000).

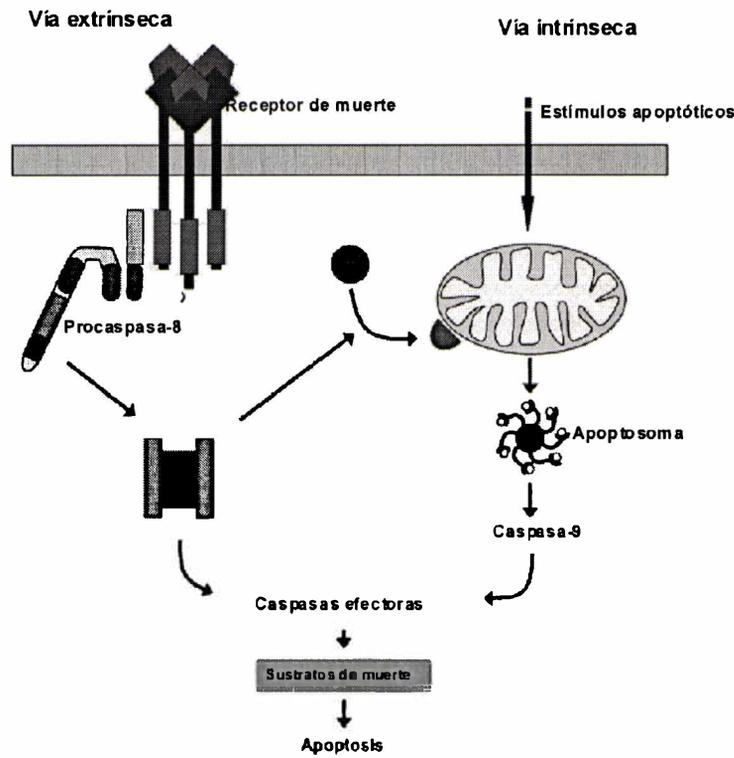


Figura 19. Vías de apoptosis. La vía intrínseca es desencadenada por estímulos extra e intracelulares que involucran a la mitocondria como principal protagonista. La vía extrínseca requiere la unión de ligandos a los receptores de la muerte. Las vías intrínseca y extrínseca convergen en las caspasas efectoras con el consecuente desarrollo de apoptosis. Modificado de Regula, 2005.

Una vez en el citosol smac-DIABLO inhiben a proteínas antiapoptóticas como ser las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs, inhibitors of apoptosis proteins) (Deveraux, 1998). El grupo de Scheubel y colaboradores ha encontrado en corazones insuficientes una menor expresión de las IAPs hecho que hace a los miocitos mas susceptibles a la apoptosis (Scheubel, 2002).

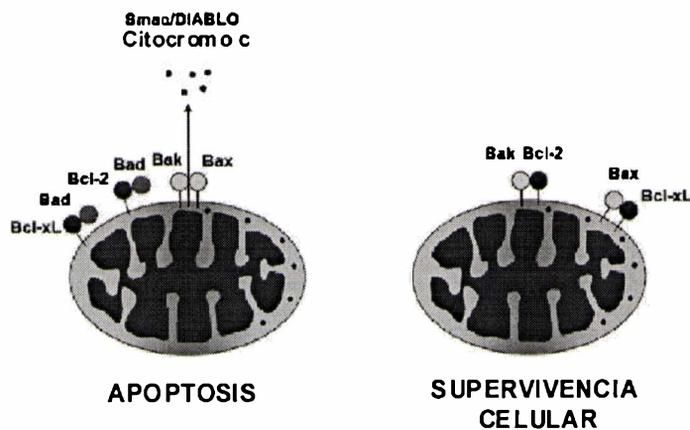


Figura 20. Esquema de las proteínas pro y anti apoptóticas. La familia de proteínas Bcl-2 funciona principalmente protegiendo la integridad de la membrana mitocondrial y controla la liberación de las proteínas pro-apoptóticas, como el citocromo c y smac/DIABLO. En condiciones normales Bcl-2 interacciona con las proteínas proapoptóticas (Bax-Bak) formando heterodímeros Bcl-2/Bax, Bcl-2/Bak y ejerciendo una función protectora. Cuando Bax o Bak se sobreexpresan aumenta la proporción de heterodímeros Bax/ Bax, Bax/ Bak y aumenta la susceptibilidad de la célula a la apoptosis

3.2.2 Necrosis

La necrosis es un proceso de muerte celular rápido e irreversible que ocurre cuando las células son severamente dañadas. A diferencia de la apoptosis es un mecanismo que no requiere energía. Se caracteriza por el hinchamiento de la célula y sus organelas, con la consecuente ruptura de la membrana y la lisis celular. El vaciamiento del contenido citoplasmático al espacio extracelular genera una respuesta inflamatoria, que causa un daño del medio circundante y muerte de las células vecinas. En muchos estudios de isquemia y reperfusión o en muestras obtenidas de corazones humanos con infarto agudo de miocardio se ha descrito muerte celular por necrosis (Kajstura, 1996; Guerra, 1999). Sin embargo en estos modelos también se ha descrito muerte celular tanto por necrosis, como por apoptosis (James, 1998; Vila Petroff, 2007). Una hipótesis que podría explicar la coexistencia de necrosis y apoptosis luego de la isquemia/reperfusión sería que el daño producido por isquemia desencadenaría la apoptosis, pero si la isquemia se prolonga y la producción de energía no es restaurada (dado que la apoptosis es un proceso que requiere ATP), se produciría un insulto mayor tal que desencadenaría la necrosis, (Gill, 2002).

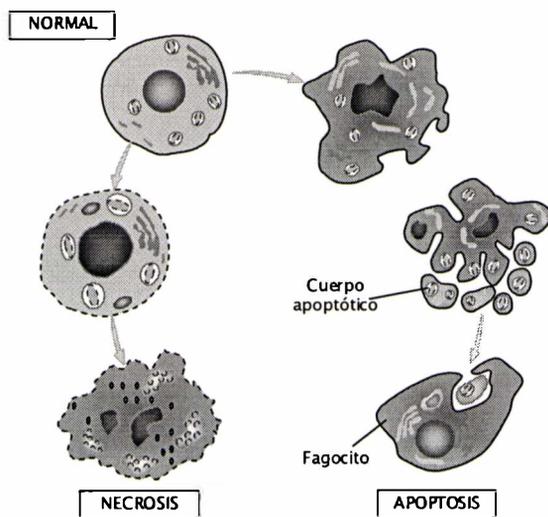


Figura 21. Esquema de las principales vías de muerte celular que muestra una célula normal y las dos vías de muerte celular, apoptosis y necrosis. Nótese que en la necrosis hay pérdida de la integridad de la membrana celular y de las organelas. En cambio en la apoptosis se conserva la membrana y se forman los denominados cuerpos apoptóticos con la consecuente fagocitosis por las células vecinas.

Debido a que la apoptosis es el mecanismo de muerte celular con más consenso en la IC, esta tesis se focalizará en este fenómeno de muerte para los estudios que se detallan a continuación.

3.3 Posibles mecanismos desencadenantes de la apoptosis en la insuficiencia cardíaca

Entre los mecanismos que se han propuesto como iniciadores de la apoptosis en la IC están las alteraciones en el Ca^{2+} intracelular, ya que disturbios en la carga de Ca^{2+} del RS pueden generar señales apoptóticas (Crow, 2004) (Para rev. ver: Orrenius, 2003) y también se ha demostrado que un exceso de Ca^{2+} en las mitocondrias puede inducir apoptosis al abrir los mPTP, con la consecuente liberación de citocromo-c, activación de caspasas y apoptosis (Szabadkai, 2004; Jeong, 2008). Sin embargo, en estos estudios no se tuvo en cuenta que el manejo del Ca^{2+} intracelular está íntimamente ligado a la homeostasis del Na^+ intracelular dado que las alteraciones del Na^+ afectan la actividad del NCX. Como vimos más arriba en miocitos aislados de corazones insuficientes, el Na^+ se encuentra elevado. Aunque las causas no han sido completamente dilucidadas, como ya lo mencionamos, este aumento de Na^+ se puede vincular tanto con un aumento en el influjo de Na^+ a través de la I_{Na} ,

como con una disminución en la expresión y en la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. Está descrito que este aumento de Na^+ promueve el aumento de Ca^{2+} a través del NCX, resultando en un aumento sostenido del Ca^{2+} diastólico a frecuencias fisiológicas (Pieske, 2002).

La proteína quinasa Ca^{2+} /calmodulina dependiente II (CaMKII) es una serina/treonina quinasa ubicua que fosforila una amplia gama de proteínas en respuesta a un aumento de Ca^{2+} intracelular y entre sus funciones más estudiadas se encuentran la regulación del AEC (Maier, 2007) y la regulación de la expresión génica (Wu, 2006). Por otra parte, se ha comprobado que la sobreexpresión de la CaMKII induce hipertrofia (Zhang, 2004; Backs, 2008) y más recientemente en un modelo de ratones con ablación génica (gene knock-out mouse) de la CaMKII, se la vinculó con la transición de la hipertrofia a la IC, ya que estos ratones sometidos a una prolongada sobrecarga de presión y carentes de la CaMKII, desarrollaron menor dilatación del ventrículo izquierdo, menor disfunción contráctil, menor número de células apoptóticas y menor fibrosis (Ling, 2009). También la CaMKII ha sido involucrada en la apoptosis por estimulación crónica con isoproterenol (Zhu, 2003) y resultados de nuestro laboratorio han demostrado un papel importante de la CaMKII en la apoptosis inducida por isquemia y reperfusión. En ese trabajo hemos demostrado que la activación del NCX durante la reperfusión, induce el influjo de Ca^{2+} que luego, a través de la fosforilación de distintos sustratos favorece la sobrecarga de Ca^{2+} del RS y el desarrollo de apoptosis (Vila-Petroff, 2007). Aunque estos estudios demuestran la participación del NCX en la apoptosis inducida por isquemia y reperfusión, su contribución en la cascada de señales apoptóticas mediadas por la CaMKII, en un marco de Na^+ aumentado, como ocurre en la IC no ha sido examinado hasta el momento. Estos resultados sugieren que la CaMKII podría ser en parte responsable de la disfunción contráctil del corazón insuficiente al promover la apoptosis en la IC. Sin embargo, las cascadas de eventos que llevan a la activación de la CaMKII y los procesos proapoptóticos por ella desencadenados en la IC no han sido examinadas hasta el momento. En este marco, un trabajo demuestra que la CaMKII puede estimular los canales rápidos de Na^+ , aumentando su probabilidad de apertura y resultando en un aumento de Na^+_i (Wagner, 2006). Tomados, estos resultados en conjunto, se podría considerar a la CaMKII como integrante de un círculo

vicioso en el que las alteraciones iniciales en el Na^+_i resultarían en un aumento de Ca^{2+}_i mediado por el NCX que a su vez activaría a la CaMKII llevando a un aumento aún mayor del Na^+ y del Ca^{2+} provocando una sobrecarga de Ca^{2+} que culminaría en la apoptosis. Por lo tanto las alteraciones del Na^+ contribuirían a la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} . Por lo tanto el Na^+ elevado podría ser una de las principales señales de iniciación de la apoptosis. **Sin embargo, si el Na^+ elevado es la alteración que gatilla el inicio de la cascada apoptótica y si esta cascada requiere la activación de la CaMKII no ha sido evaluado hasta el momento.**

Examinar si el Na^+ elevado puede inducir la apoptosis será el segundo objetivo de esta tesis.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GENERALES

La presente tesis está dirigida a examinar los principales mecanismos responsables de la disfunción contráctil que se observa en el corazón insuficiente. Específicamente, estudiaremos el papel que tiene las alteraciones en el manejo del Ca^{2+} ; en el desarrollo de la escalera negativa y en la pérdida de unidades contráctiles por apoptosis, ya que ambos fenómenos son de fundamental importancia en el deterioro de la función contráctil en la insuficiencia cardíaca. Esta disfunción contráctil que presentan los corazones insuficientes revela la incapacidad de los mismos para aumentar la fuerza de contracción frente a una mayor demanda, de modo que comprender las bases subcelulares y moleculares de estos fenómenos puede resultar en un importante avance en el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas.

Esta tesis describe por lo tanto los resultados de dos trabajos experimentales, que aunque diferentes, están relacionados entre sí por un denominador común que es la disfunción contráctil de la insuficiencia cardíaca (IC).

En el primero de ellos, el objetivo fue reproducir a nivel de un miocito cardíaco las tres alteraciones del acoplamiento éxcito contráctil (AEC) que se describen clásicamente en la mayor parte de los modelos de IC (disminución en la expresión de la SERCA2a, aumento en la expresión del NCX y aumento de la concentración de Na^+ intracelular) y determinar si éstas mimetizan, asociadas o independientemente, una de las principales características de la IC como es el fenómeno de la escalera negativa.

En el segundo, el propósito fue examinar si existe alguna relación entre estas alteraciones en el AEC y la apoptosis, que como ya se mencionó previamente, es una causa fundamental de la disminución de la contractilidad en la IC. Debido a que la disminución en la expresión del NCX (y no su aumento como ocurre en la IC) y la sobreexpresión de SERCA2a (y no su disminución, como ocurre en la IC) se asociaron a apoptosis, (Miyamoto, 2005; Vafiadaki, 2009), nos concentramos en el estudio del posible rol del aumento del Na^+ intracelular en la producción de este tipo de muerte celular.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar cuál es la contribución relativa de las tres alteraciones básicas del AEC en la IC al fenómeno de la escalera negativa: la alteración en la retoma de Ca^{2+} (disminución en la expresión de la SERCA2a), el efecto de la sobreexpresión del NCX y el aumento del Na^+ intracelular.
2. Examinar si se necesita más de una de estas alteraciones en el manejo del Ca^{2+} intracelular para reproducir la escalera negativa característica del corazón insuficiente.
3. Examinar si el Na^+ elevado, característico de la IC, es la alteración que puede promover la apoptosis.
4. De confirmarse el punto anterior, aclarar si este fenómeno se produce a través de su efecto sobre la función del NCX.
5. Dilucidar los mecanismos intracelulares de este fenómeno, con especial énfasis en la posible participación de la CaMKII.

3. HIPÓTESIS

El cumplimiento de estos objetivos nos permitirá poner a prueba las siguientes hipótesis:

1. La alteración simultánea en la retoma de Ca^{2+} , la sobreexpresión del NCX y el aumento del Na^+ intracelular son necesarios para producir la escalera negativa de la IC.
2. Estas alteraciones son suficientes para mimetizar el fenotipo contráctil de un miocito aislado de un corazón insuficiente.
3. La elevación del Na^+ intracelular disminuye la viabilidad y promueve la apoptosis en miocitos aislados.
4. El Na^+ aumentado promueve el funcionamiento del modo revertido del NCX que ingresa Ca^{2+} a la célula, resultando en la activación de la CaMKII, que desencadena la cascada apoptótica.

Para poner a prueba estas hipótesis y cumplir con los objetivos propuestos se realizaron los siguientes experimentos:

Parte 1: para reproducir las alteraciones básicas del manejo de Ca^{2+} en la IC, en una célula aislada de un corazón sano: 1) se inhibirá parcialmente la

SERCA2a usando taspigarguina (Tg), ácido cyclapiozonico (CPA) o ARN silenciador de la SERCA2a (Ad.siRNA); 2) sobreexpresaremos al NCX utilizando la técnica de transferencia génica mediada por adenovirus portadores del gen del NCX; 3) aumentaremos el Na^+ , inhibiendo la bomba Na^+/K^+ -ATPasa con ouabaina o monensina. Verificaremos si la alteración de uno solo de estos mecanismos reguladores del AEC es suficiente para transformar la escalera positiva de las células normales a una negativa similar a la observada en el corazón insuficiente, o, si es necesaria la acción conjunta de los mismos. Los resultados nos permitirán determinar la importancia relativa de la disminución de actividad de la SERCA2a, de la sobreexpresión de NCX o del Na^+ aumentado y cuál o cuáles de estos mecanismos son responsables del fenómeno de la escalera negativa.

Parte 2: para mimetizar el aumento de Na^+ , descrito en el corazón insuficiente y examinar si esta alteración produce apoptosis a través del funcionamiento del modo reverso del NCX con la consecuente sobrecarga de Ca^{2+} y activación de CaMKII: a) Cultivaremos miocitos durante 24 hs utilizando ouabaína o digoxina y evaluaremos su efecto en la viabilidad celular. Adicionalmente, estos cultivos serán utilizados para realizar pruebas bioquímicas (actividad de caspasa-3 y cociente Bax-Bcl-2) para evaluar si la muerte celular es debida a la apoptosis. B) en una serie de experimentos cultivaremos los miocitos durante 24 hs en presencia de ouabaína más el inhibidor del NCX, KB-R9743 (KBR) o en presencia del inhibidor de la CaMKII, KN-93 (KN) y evaluaremos los mecanismos de muerte celular midiendo la actividad de caspasa-3 y el cociente Bax/Bcl-2. En otro grupo de experimentos sobreexpresaremos a la CaMKII utilizando la técnica de transferencia génica mediada por adenovirus portadores del gen de la CaMKII, para verificar el rol de esta quinasa en la cascada apoptótica.

METODOLOGÍA

Aspectos Generales

Los experimentos fueron llevados a cabo respetando las normativas generales para uso de animales de laboratorio estipuladas en la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, 1996" Los experimentos se realizaron en miocitos aislados de corazones de gatos adultos y de ratas macho Wistar (200-300g).

1. AISLAMIENTO DE MIOCITOS

Se realizaron experimentos en miocitos de gato y rata aislados enzimáticamente con una técnica utilizada rutinariamente en nuestro laboratorio. En esta técnica, gatos adultos fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (35 mg (Kg peso)⁻¹). Los corazones sujetos por la aorta a través de una cánula fueron extraídos rápidamente y colocados en un sistema de perfusión tipo Langendorff. A continuación los mismos fueron perfundidos retrógradamente a 37°C y presión de perfusión constante (70 a 80 mmHg) durante 7 minutos para lavar los restos de sangre y estabilizar el corazón con una solución con la siguiente composición (en mM): ClNa 146.2, ClK 4.7, Cl₂Ca 1.35, ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 10.0, PO₄NaH₂ 0.35, SO₄Mg 1.05, glucosa 10.0, la solución fue ajustada a pH 7.4 con OHNa, llamaremos a esta solución solución de HEPES. La solución fue continuamente burbujeada con O₂ al 100%. Luego de los 7 minutos, la perfusión continuó por cinco minutos con la misma solución, pero ahora nominalmente libre de Ca²⁺. Este período de perfusión con una solución libre de Ca²⁺ es de crucial importancia, ya que la integridad de los discos intercalares depende del Ca²⁺ y se ha descrito que bajos niveles del ión reducen la adherencia entre las células (Sollott, 1992).

Posteriormente se hizo recircular la solución HEPES con 0.61mg/ml de colagenasa tipo II (160 U/ml), 0.07mg/ml de proteasa y 0.4mg/ml de suero de albúmina bovina (BSA). Además se agregó 50 μM Cl₂Ca, ya que el Ca²⁺ actúa como un cofactor que activa las enzimas (Bkaily, 1984). La perfusión continuó hasta que los corazones presentaron flacidez (15-20 min) y rápidamente fueron

removidos del aparato de perfusión cortándolos a nivel aurículo-ventricular. Los miocitos aislados se separaron del tejido no digerido y se lavaron varias veces con solución HEPES conteniendo BSA 1%, y 0.5 mM de Cl_2Ca . El tejido ventricular no digerido fue cortado y disociado con pinzas. Dicho tejido se incubó durante 3-5 minutos a 37°C , agitándolo lentamente en una atmósfera de O_2 en la misma solución con enzimas. Luego de este procedimiento los miocitos desagregados fueron separados del tejido sin digerir mediante su centrifugación a aproximadamente 1000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en una solución HEPES con 0.5 mM de Cl_2Ca . Al tejido remanente, sin digerir, se lo incubó en el agitador como se describe más arriba. Este proceso se repitió hasta digerir la mayor cantidad de tejido posible. Luego de cada lavado, las células fueron dejadas sedimentar durante 10 min, y en cada resuspensión se fue incrementando paulatinamente la concentración de Ca^{2+} extracelular hasta llegar a una concentración de 1.35 mM de Ca^{2+} . La recalcificación lenta y gradual tiene como objetivo minimizar el deterioro que se produce cuando se recalcifica luego de un período de perfusión libre de Ca^{2+} (Zimmerman, 1965). Los miocitos aislados suspendidos en solución HEPES fueron mantenidos a temperatura ambiente ($20\text{-}22^\circ\text{C}$) hasta su utilización, sea para experimentos con miocitos frescos o para su posterior cultivo.

Para el aislamiento de miocitos ventriculares de rata se siguió el mismo protocolo, con algunas modificaciones. En este caso la concentración final de Ca^{2+} en la solución de HEPES fue de 1 mM y la concentración de colagenasa fue de 0.24mg/ml.

2. CULTIVO DE LOS MIOCITOS

Después del aislamiento, las células fueron resuspendidas en medio de cultivo DMEM (estas siglas provienen del término inglés: Dulbeccos Minimal Eagle Medium), con el agregado de los siguientes suplementos (g/L): ácido ascórbico 0.0176, albúmina sérica bovina 2, L-carnitina 0.4, creatina 0.66, taurina 0.62, penicilina 50U/mL y estreptomina 50 U/mL. Los miocitos fueron luego contados y sembrados a una densidad de 2×10^4 en cajas de cultivo estériles. Las cajas de cultivo fueron previamente tratadas con laminina ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) durante 40 minutos para permitir una mejor adhesión de las células. Se dejaron las células durante una hora en estufa gaseada con CO_2 a 37°C . Luego de este

período se retiró el medio de cultivo para extraer las células muertas y dejar sólo las vivas que permanecieron adheridas a la lamina, se colocó 2 ml de medio de cultivo fresco por cada caja de cultivo en presencia o ausencia de los diferentes compuestos farmacológicos o partículas virales (ver resultados).

3. INFECCIÓN CON ADENOVIRUS

Se utilizaron adenovirus recombinantes, portadores del gen del NCX y de la proteína fluorescente verde GFP (Ad.NCX.GFP), adenovirus recombinantes del gen de la CaMKII_{δC} y de la proteína fluorescente verde GFP (Ad.CaMKII.GFP) y adenovirus recombinantes portadores de templados de DNA para la síntesis del ARN silenciador de la SERCA2a (Ad. siRNA. SERCA2a) y GFP sintetizados por el Dr. R. Hajjar del Mount Sinai Medical Center, New York. Para la construcción de los adenovirus se siguió el método de He y colaboradores (He, 1998; Luo, 2007). Una vez aislados, los miocitos fueron cultivados durante 48 Hs en presencia de Ad.NCX.GFP a un múltiplo de infección (MOI) de 10-1000, o en presencia de Ad.siRNA.SERCA2a a un MOI de 100 y 400 o en presencia de Ad.CaMKII.GFP a un MOI de 100. (Para ver detalles de la construcción de lo adenovirus y de su biología básica, ver apéndice 1).

3.1 Verificación de la expresión de proteínas recombinantes

Para verificar la eficiencia de infección de los adenovirus recombinantes, se visualizó la GFP en un microscopio de fluorescencia excitando a las células a una longitud de onda de 480 nm y visualizando la luz verde emitida a 530 nm. De esta manera, las células que se visualizan verdes por la expresión de la proteína fluorescente verde GFP, son las que coexpresan la proteína de interés. Para cuantificar el grado de expresión de las proteínas recombinantes, se utilizó la técnica de western blot, que se detallará mas adelante.

4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA SERCA2a

La actividad de la SERCA2a fue evaluada por la medición de la reducción de la concentración de Ca²⁺ extracelular utilizando el indicador INDO-1 en miocitos permeabilizados con digitonina (Mattiuzzi, 1994). Brevemente, se utilizó 10 µM de ruthenium red para bloquear la liberación de Ca²⁺ del RS e inhibir la retoma de Ca²⁺ por la mitocondria y se utilizó oxalato de potasio 10 mM para precipitar el Ca²⁺ de

RS. Bajo estas condiciones, la adición de 10 μM CaCl_2 resultó en un incremento rápido de la $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular, que luego, en menos de 5 minutos descendió a las $[\text{Ca}^{2+}]$ basales. La disminución del Ca^{2+} extracelular es proporcional a la velocidad de retoma de Ca^{2+} por el RS. Las diferencias obtenidas entre los niveles de Ca^{2+} extracelulares en presencia o ausencia de tapsigargina (Tg) (0.1-10 μM) o ácido ciclopiazónico (CPA) (1-10 μM) fueron utilizados como índice del grado de inhibición de la SERCA2a.

5. MEDIDAS DE LA FLUORESCENCIA DE INDO-1 Y ACORTAMIENTO CELULAR

Fluorescencia de Indo-1

Los miocitos se incubaron con el indicador de Ca^{2+} Indo-1AM disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) y ácido plurónico, para lograr una mejor dispersión del indicador. Las células se incubaron con el indicador durante 9 minutos a una concentración 17 μM y a temperatura ambiente, de acuerdo al método de Spurgeon y col (Spurgeon, 1990). En general los experimentos en que se miden cambios cinéticos 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, que se determinan en cada situación experimental, permite obtener el máximo número de moléculas de indicador internalizadas por cada célula individual. Luego de este período de incubación las células se lavaron y se las dejó desesterificar durante 45 minutos.

El Indo-1 en su forma permeante éster de acetoximetilo llamada "AM", se comporta, al igual que todas las formas AM de los distintos indicadores fluorescentes, como una molécula lipofílica (hidrofóbica) y sin carga, propiedades que le permiten atravesar las membranas celulares. Una vez en el citosol, las esterasas endógenas hidrolizan al indicador liberándolo de su porción AM y transformándolo en su forma ácida activa, la cual es impermeable al sarcolema. Esto impide que el indicador se "escape" de la célula. Una propiedad importante del indicador de Ca^{2+} es su selectividad por el Ca^{2+} sobre el Mg^{2+} ; el Indo-1 tiene un Kd para el Ca^{2+} de aproximadamente 250 nmol/L, por lo que es muy específico para la medición del Ca^{2+}_i .

Las células cargadas con el indicador de Ca^{2+} fueron luego colocadas sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon Diaphot 200) adaptado para la epifluorescencia. Las células fueron perfundidas continuamente con HEPES (pH 7.4) a un flujo constante de 1 ml/m y se realizó estimulación por campo a través de dos electrodos de platino colocados a cada lado de la cámara de perfusión (ondas cuadradas de 2 ms de duración y de una intensidad de 20 % por encima del umbral) a una frecuencia de 30 pulsos/min. Las células fueron iluminadas por un haz de luz centrado a 350 nm y la fluorescencia emitida por las mismas registrada a 410 y 490 nm, fue adquirida por dos fotomultiplicadores. La fluorescencia inespecífica (fondo) se sustrajo de cada señal, antes de obtener el cociente de fluorescencia 410/490. Para obtener el cociente de fluorescencia diastólico se consideró el valor promedio de dicho cociente en un período de 100 ms luego de que la contracción se completara. El cociente de fluorescencia sistólico fue determinado directamente por el pico del cociente registrado.

La platina del microscopio fue iluminada con luz roja (640-750 nm) a través de un sistema óptico para luz visible, con el fin de permitir mediciones simultáneas de fluorescencia y acortamiento celular.

Medida del acortamiento celular.

La longitud de reposo y el acortamiento celular (AC) fueron medidos simultáneamente usando un detector de movimientos de bordes controlado por video (Crescent Electronics, SALT Lake City, UTA) y los datos fueron almacenados en un software para su posterior análisis.

6. MEDIDAS DE Na^+_i EN MIOCITOS AISLADOS

Para la medida de $[\text{Na}^+]_i$ las células fueron cargadas durante 2 hrs con el indicador fluorescente SBFI (sodium-binding benzofuran isophthalate) a una concentración final de 10 μM . La fluorescencia del SBFI fué excitada a $340 \pm 5 \text{ nm}$. La fluorescencia emitida a $410 \pm 5 \text{ nm}$ y a $590 \pm 5 \text{ nm}$, -recolectada por el objetivo del microscopio y transmitida a través de filtros a dos fotomultiplicadores (R2693, Hamamatsu) y luego a través del convertidor analógico digital a la computadora- representan las formas del indicador sensibles e insensibles al Na^+ , respectivamente. Su relación o cociente fué considerado como una medida del $[\text{Na}^+]_i$. Debido a que el SBFI permanece en el citosol, es posible la calibración de la relación de fluorescencias

emitidas por el indicador en valores absolutos de Na^+ . Por lo tanto al final de cada experimento se calibró la fluorescencia emitida. Para ello, las preparaciones fueron expuestas a una solución de gramicidina 2 μM ; monensina 5 μM ; y ouabaína 0.05 mM. Las soluciones de calibración fueron ajustadas a cuatro concentraciones diferentes de Na^+ (entre 4 y 16 mM) mezclando apropiadamente soluciones de alto (150 mM) y bajo (0 mM) Na^+ . Los valores de Na^+ fueron estimados para cada célula de acuerdo a su respectiva calibración *in vivo*.

7. MEDIDAS DE VIABILIDAD CELULAR

Las células fueron clasificadas en viables y no viables luego del cultivo por 24 hs con su respectivo tratamiento, de acuerdo al método morfométrico. Las células cuyo cociente entre su longitud y su ancho fué mayor a 3, fueron consideradas viables (Vila Petroff, 2007). Cada cultivo, fué considerado como $n=1$. Las células sembradas se visualizaron al microscopio óptico y se tomaron fotografías de 8 campos diferentes por grupo para su posterior análisis estadístico.

8. MEDIDAS DE APOPTOSIS

La muerte celular programada o apoptosis se midió por dos métodos diferentes, a través de la actividad de Caspasa-3 y a través del cociente Bax/Bcl-2.

Actividad de caspasa-3: como vimos anteriormente la caspasa-3 es una de las cisteínas proteasas mas frecuentemente activada durante los procesos apoptóticos y se vincula su actividad con este fenómeno, ya que es una efectora final de las diferentes cascadas apoptóticas (Kothakota, 1997). La actividad de la misma fue determinada utilizando un substrato fluorescente de la caspasa-3, PhiPhiLux (OncoImmunin; Gaithersburg, MD). Este substrato es sintetizado acoplado covalentemente a un fluoróforo y contiene una secuencia de aminoácidos determinada, la cual es reconocida y clivada específicamente por la caspasa-3. Una vez clivado, emite un pico de fluorescencia que puede observarse al microscopio de fluorescencia.

Una vez cultivados los miocitos y sometidos a un tratamiento específico se procedió a su procesamiento con PhiPhiLux. Para esto, se retiró el medio de cultivo, quedando los miocitos adheridos en el fondo de la cajita de Petri. Se reemplazó el medio por un buffer salino. En nuestro protocolo experimental utilizamos PBS (de sus siglas en inglés: phosphate buffered saline) se realizaron 2-3 lavados y luego los

miocito se incubaron durante 40-60 minutos con la solución de PhiPhilux. Pasado este tiempo se realizaron otros 2-3 lavados con PBS y se procedió a observar en el microscopio de fluorescencia. Para cuantificar las células apoptóticas, cada cultivo fue considerado $n=1$ y se fotografiaron al menos 8 fotos por condición experimental. Las células que emitían fluorescencia (color verde) fueron consideradas caspasa-3 positivas, por lo tanto apoptóticas.

Cociente Bcl-2/Bax: como se mencionó en la introducción, la familia de proteínas Bcl-2 constituye un punto de regulación en la apoptosis. Esta familia posee proteínas proapoptóticas (Bax, Bad, Bid, etc) y antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1, etc). La relación entre proteínas anti- y pro-apoptóticas, tal como Bax/Bcl-2 determina la respuesta a una señal de muerte. Cuando esta relación aumenta, es indicativo de activación de proceso de apoptosis, y en forma recíproca, si esta relación disminuye es indicativo de una menor sensibilidad a la apoptosis. El análisis del grado de expresión de estas proteínas se realizó mediante western blot, que se detalla a continuación.

9. PREPARACIÓN DE MUESTRAS, ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT

Preparación de muestras.

Para el estudio de la relación Bax/Bcl-2 y el grado de expresión del NCX, SERCA2a y calsecuestrina, los miocitos fueron recolectados cuidadosamente para evitar la ruptura de los mismos y resuspendidos en un buffer de lisis conteniendo (en mM): sodio-glicerofosfato 20, EGTA 1, Na_3VO_4 0.2, DTT 2, EDTA 2, NaF 20, triton x-100 0.01%, Igepal 1% e inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 1 μM de peptastina y 10 mM de benzamidina). Una vez resuspendidas las muestras, se colocaron rápidamente en hielo y fueron sonicadas dos veces durante 20 segundos y se colocaron en hielo durante 30 minutos. Durante ese lapso las muestras se vortearon cada 10 minutos y luego de esto, se centrifugaron durante 15 minutos a 13.200 rpm a 4°C. Por último se recolectó el sobrenadante que es la fracción que contiene las proteínas, descartando el "pellet" que es el que contiene las membranas celulares y otros restos celulares. El sobrenadante se alicuotó y se conservó a -80°C hasta su utilización. La concentración de proteínas se midió mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) con seroalbúmina bovina como proteína estándar para la curva de calibración.

Electroforesis.

Se realizó la separación electroforética del NCX, la SERCA2a y calsecuestrina en geles de poliacrilamida-SDS (minigeles de 1 mm de espesor y una resolución de 7.5% de acrilamida) de acuerdo a la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970) y para la separación de Bax y Bcl-2 se utilizó el mismo gel pero la resolución fue de 15 % de acrilamida (lo que ofrece un tamaño de poro mayor). Para una correcta apilación y corrida de las proteínas se utilizó un gel de apilamiento según la siguiente composición: acrilamida 4%, Tris-HCl 125 mM (pH 6.8), glicerol 5%, SDS 0.1%. La polimerización de todos los geles fue catalizada por el agregado de tetrametilendiamina 0.08% y se inició por el agregado de trazas de persulfato de amonio. Las muestras se disolvieron en solución solubilizante (SDS 2%, Tris/HCl 62.5 mM a pH 6.8, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,001% como frente de corrida). Para estos ensayos se sembraron las siguientes concentraciones de proteínas: 20 μ g (NCX), 20 μ g (SERCA2a), 20 μ g (calsecuestrina) y 30 μ g (Bcl-2/Bax). La electroforesis se realizó a potencial constante comenzando con 90 voltios durante el apilamiento de las muestras y luego a 120 voltios durante la resolución de las proteínas. Finalizada la electroforesis, los geles se estabilizaron en solución de transferencia (Tris 25mM, glicina 192 mM, Metanol 15%) e inmediatamente las membranas se transfirieron mediante electroforesis en condiciones semisecas a una membrana de polivinilideno difluoruro (Immobilon-P, Millipore USA), durante 60 minutos a 12 voltios. Para verificar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana se usó el método de tinción reversible rojo Ponceau S. Para eliminar el colorante se lavaron las membranas 2 ó 3 veces con solución salina amortiguadora de Tris adicionado con 0.1% de detergente Tween 20 (TBS-T, del inglés Tris Buffered Saline, Tris 50 mM y Na Cl 150 mM, pH 7.4). Una vez libres del colorante, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en TBS-T con el objeto de bloquear los sitios libres de proteínas en la membrana, y así evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la superficie de la membrana, debido a que éstos también son proteínas. Una vez bloqueadas las membranas, se incubaron durante la noche con los siguientes anticuerpos primarios.

- Anticuerpo policlonal dirigido contra NCX (anti-NCX, Chemicon) diluido 1:1000 en solución 1% de leche descremada en TBS-T.

- Anticuerpo policlonal dirigido contra SERCA2a (Anti-SERCA 2^a, Badrilla, Leeds, UK) diluido 1:5000 en solución 1% de leche descremada en TBS-T.
- Anticuerpo policlonal dirigido contra calsecuestrina (anti-calsecuestrina, Affinity Affinity Bioreagents) diluido 1:1000 en solución 1% de leche descremada en TBS-T.
- Anticuerpo policlonal dirigido contra Bax (anti-Bax, sc-493, Santa Cruz Biotechnology, USA), generado en conejo, diluido 1:1000 en solución 1% de leche descremada en TBS-T.
- Anticuerpo policlonal dirigido contra Bcl-2 (anti-Bcl-2, sc-492, Santa Cruz Biotechnology, USA) generado en conejo, diluido 1:1000 en solución 1% de leche descremada en TBS-T.

Luego de la incubación con los anticuerpos primarios, y para la detección de los mismos se lavaron las membranas 5 veces (un lavado de 15 minutos y cuatro de 5 minutos) con TBS-T y luego se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa. Para los anticuerpos anti-Bax y anti Bcl-2 se utilizó un anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo (1:20.000, Santa Cruz, California, USA) y nuevamente se realizaron 5 lavados para quitar el exceso de anticuerpo. El revelado se realizó sobre placas radiográficas por reacción de quimioluminiscente con el uso de un Kit comercial (ECL Plus, Amersham Biosc., USA), obteniéndose bandas de diferente intensidad y tamaño de acuerdo a la cantidad de antígeno detectado.

La cuantificación de las bandas se realizó con un programa de computación (Image J 1.37v NIH, USA), con el que se mide la intensidad de las señales digitalizadas por escaneo de las placas radiográficas

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados promedio se expresan como la media \pm error estándar. Para el estudio de significación se utilizó el test de t-Student para muestras apareadas o independientes. Para la comparación entre diferentes grupos se utilizó el test de Análisis de Varianza (ANOVA) seguido del test de Newman-Keuls. En todos los casos se consideró $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. RESULTADOS PARTE 1

(Estudio en miocitos de gato que presentan escalera positiva).

1.1 Inhibición de la SERCA2a: estrategia farmacológica y de transferencia génica

La disminución en la retoma de Ca^{2+} por el RS, como ya habíamos mencionado, es una de las alteraciones que ha sido propuesta como mediadora de la escalera negativa en el corazón insuficiente. Con el objetivo de mimetizar esta alteración, y evaluar su efecto sobre el fenómeno de la escalera, la SERCA2a fue inhibida utilizando dos estrategias. La primera consistió en una inhibición farmacológica usando dos inhibidores diferentes: tapsigargina (Tg) y ácido ciclopiazónico (CPA). En un grupo de experimentos controles se comprobó la eficacia de estas drogas para inhibir la retoma de Ca^{2+} por el RS. Estos experimentos se realizaron en células permeabilizadas en las que los mecanismos de extrusión o entrada de Ca^{2+} a la célula habían sido eliminados. Se utilizó rutenium red para inhibir la liberación de Ca^{2+} del RS y la toma por la mitocondria y también se utilizó oxalato de potasio para precipitar el Ca^{2+} del RS. De esta manera, luego del agregado de CaCl_2 la velocidad con la que la $[\text{Ca}^{2+}]$ vuelve a los valores basales indica la actividad de la SERCA2a. La figura 22 muestra experimentos típicos y sus datos promedios, que indican que el incremento en la concentración de Tg y CPA de 0.1 a 1 μM y de 1 a 10 μM respectivamente, reducen los valores de la retoma de Ca^{2+} por el RS luego de un pulso de Ca^{2+} de manera dosis-dependiente en miocitos aislados y permeabilizados. Basado en estos resultados, se seleccionaron 1 μM de Tg y 10 μM de CPA para obtener una casi completa inhibición de la retoma de Ca^{2+} por el RS.

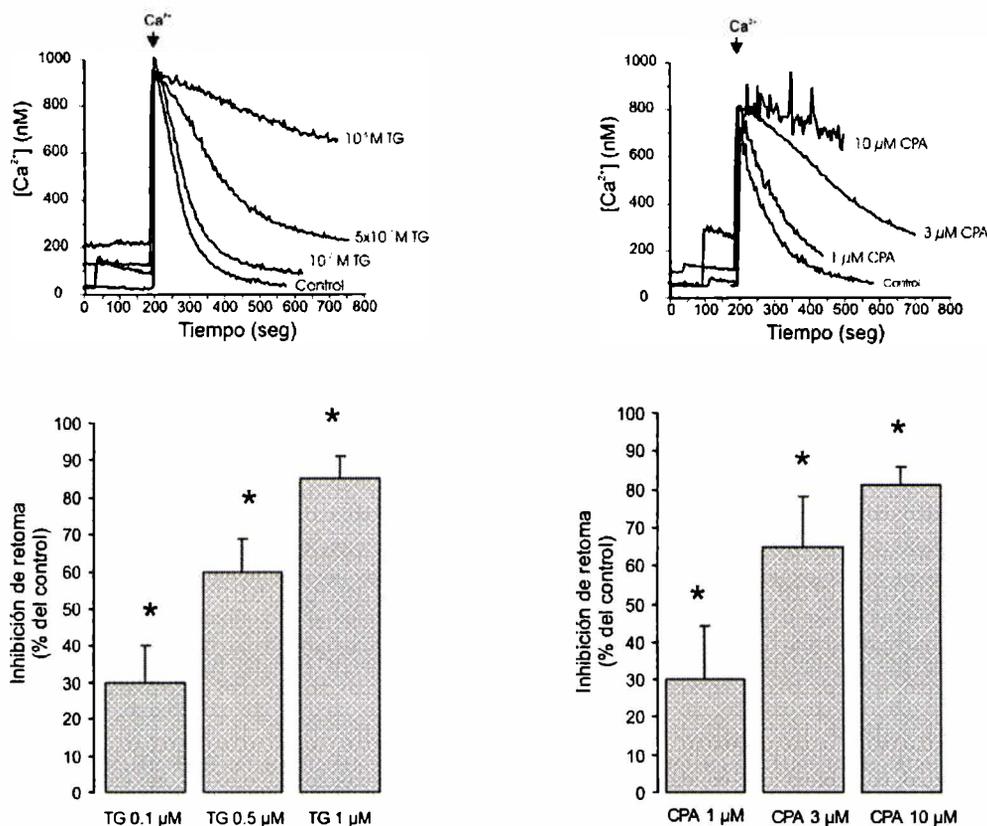


Figura 22. La thapsigargin (TG) y el ácido ciclopiazónico (CPA) inhiben la retoma de Ca^{2+} . Los gráficos indican que la adición de Ca^{2+} a una suspensión de miocitos permeabilizados y con los mecanismo de extrusión de Ca^{2+} inhibidos, causa un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ libre, seguido de un retorno a los valores basales (control). La TG o el CPA enlentecen el retorno a los valores basales de la $[Ca^{2+}]_i$ libre de manera dosis-dependiente. ($n=8$) Los gráficos de barras muestran los resultados promedio del efecto de Tg o CPA sobre la retoma de Ca^{2+} por el RS. Aún bajas concentraciones de Tg o CPA causan una significativa inhibición de la retoma de Ca^{2+} por el RS. $*p<0.05$ respecto a la ausencia de droga

En un grupo adicional de experimentos se utilizó un pulso de cafeína para evaluar la carga del RS luego de incubar a los miocitos con $1 \mu M$ de Tg. En la figura 23 se puede observar que el transitorio de Ca^{2+} producido luego de un pulso de cafeína no se produce cuando los miocitos están incubados con Tg, indicando que la SERCA2a está inhibida y por lo tanto el RS no puede cargarse.

Estos resultados confirman la eficacia de la Tg para inhibir la retoma de Ca^{2+} del RS.

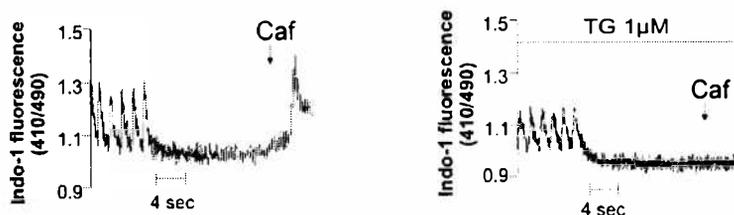


Figura 23. La TG previene la liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína. En presencia de TG la administración de un pulso rápido de cafeína no provoca el típico aumento transitorio de Ca^{2+} .

La segunda maniobra consistió en la utilización de tecnología de transferencia génica de un siARN dirigido específicamente a la SERCA2a para disminuir su expresión. La disminución en la expresión de la SERCA2a se logró transfectando miocitos de gato adulto por 48 hs con Ad.siRNA.SERCA2a a un MOI de 100 ó 400. Simultáneamente se transfectaron miocitos con un virus portador del gen de la β -galactosidasa para servir de grupo control. La disminución en el grado de expresión de la SERCA2a fue determinada por western blot. Observamos una disminución dosis-dependiente en la expresión de la SERCA2a. Con un MOI de 100 obtuvimos una reducción de $42\pm 3\%$ y con un MOI de 400 una reducción de $67.7\pm 3\%$ ($n=3$, de 3 corazones), expresado como porcentaje respecto a los niveles de proteína SERCA2a en los miocitos que transportan el gen de la β -galactosidasa (ver figura 24).

Estos resultados nos llevaron a utilizar una dosis de 400 MOI para los experimentos restantes.

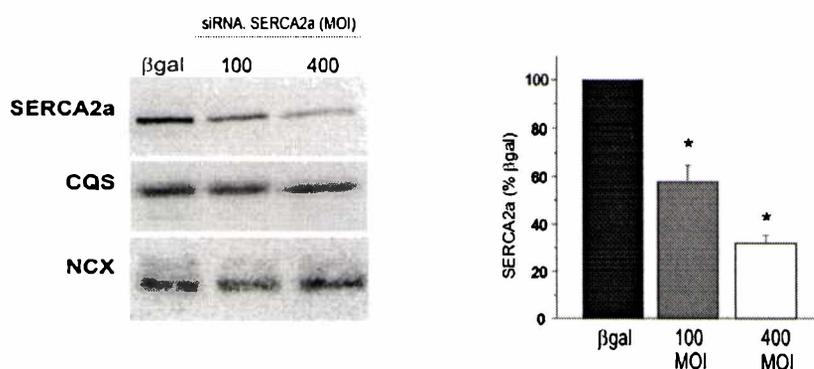


Figura 24. Efecto de siRNA.SERCA2a sobre la expresión de la SERCA2a. Western blot representativos y resultados promedio del grado de expresión de las proteínas SERCA2a, Na^+/Ca^{2+} (NCX) y calsecuestрина (CSQ) en células que sobreexpresan β .gal o ad.siRNA.SERCA2a. La expresión de la SERCA2a disminuyó solo en las células infectadas con ad.siRNA.SERCA2a. Otras proteínas del manejo del Ca^{2+} intracelular (NCX y CSQ) permanecieron sin cambios. * $p < 0.05$ respecto a la situación control ($n=3$).

1.2 Efecto de la inhibición de la SERCA2a en la relación acortamiento-frecuencia

Una vez que se encontraron las dosis adecuadas para mimetizar la disminución en la retoma de Ca^{2+} por el RS en la IC, se realizaron experimentos funcionales en miocitos aislados de gato donde se estudió el efecto de las distintas maniobras utilizadas para inhibir la SERCA2a sobre la relación acortamiento-frecuencia (fenómeno de la escalera).

Se evaluó la relación acortamiento-frecuencia en los miocitos aislados a temperatura ambiente, a tres frecuencias de estimulación diferentes (10, 30, 50 latidos/minuto), en presencia de Tg, CPA y en miocitos cultivados e infectados con Ad.siRNA.SERCA2a. En estudios previos de nuestro laboratorio se ha observado en miocitos de gato, que frecuencias mayores a 50 latidos/minuto (y a temperatura ambiente) no producen mas aumento en la contractilidad (Vila petroff, 2003). Por lo tanto, los experimentos se realizaron en el rango de frecuencia de estimulación donde encontramos escalera positiva.

Los resultados que se presentan en la figura 25 muestran un aumento en la amplitud de la contracción con el incremento de la frecuencia de estimulación (escalera positiva) tanto en situación control como cuando la SERCA2a es inhibida por las maniobras arriba descritas. Estos resultados sugieren que la disminución de la actividad de la SERCA2a no es suficiente para inducir la escalera negativa observada en la IC. Aunque a primera vista, es difícil de explicar la presencia de escalera positiva en presencia de un RS disfuncional, es importante destacar que la escalera positiva también depende de otros factores tales como un incremento en la corriente de Ca^{2+} , que puede inducir una escalera positiva, aun en ausencia de un RS funcional y en un aumento del Ca^{2+} diastólico debido a un aumento en el influjo de Ca^{2+} y una disminución del eflujo del mismo. Esta disminución del eflujo de Ca^{2+} ha sido atribuida a una menor velocidad de salida del ión a través del NCX, debido al aumento de Na^+ , producido por el aumento de la frecuencia de estimulación (Bers, 2001). En la tabla 1 presentada al final de los resultados de la primera parte, se muestra el efecto de las distintas intervenciones utilizadas para inhibir la SERCA2a, sobre la contractilidad basal y su cinética.

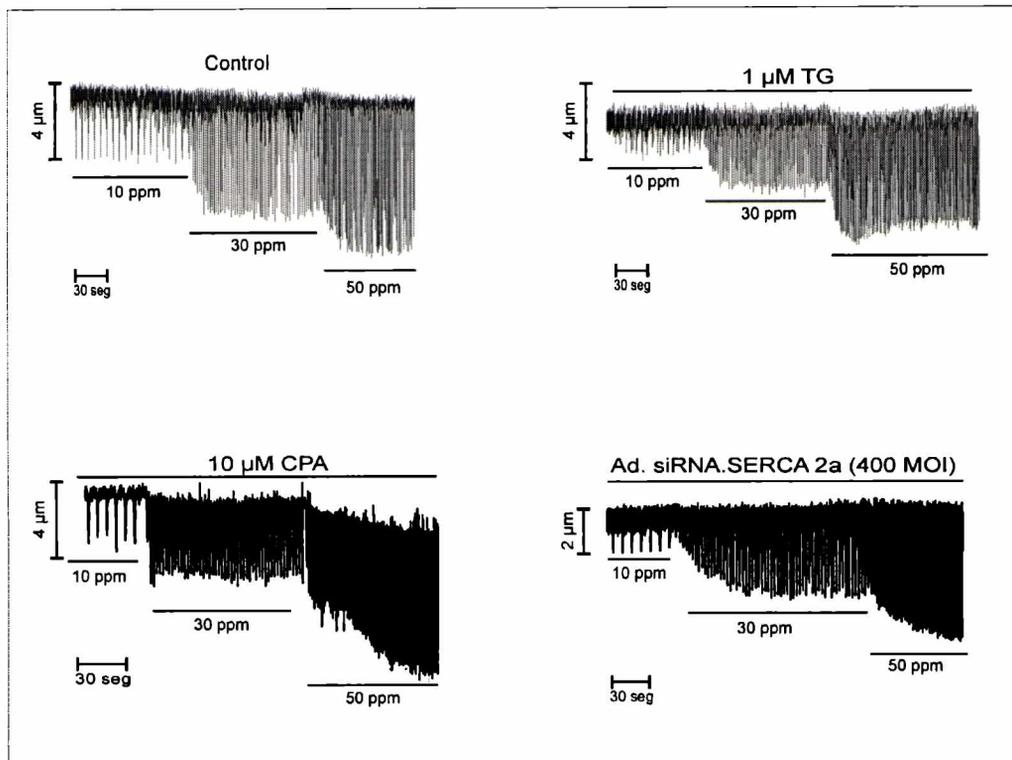


Figura 25. *Relación acortamiento-frecuencia en ausencia de un RS funcional.* La inhibición de la SERCA2a no es suficiente para inducir una relación acortamiento-frecuencia negativa. La figura muestra registros continuos típicos de longitud celular a 3 a frecuencias de estimulación diferentes (10, 30 y 50 pulsos/minuto) en ausencia de inhibidores (control) en presencia de 1 μM de tapsigargina, 10 μM de ácido ciclopiazónico y en miocitos cultivados e infectados con Ad.siRNA.SERCA2a. Todos los trazos muestran un aumento en la amplitud de contracción con el incremento en la frecuencia de estimulación.

1.3 Estudio del efecto del aumento de Na^+_i en la relación acortamiento-frecuencia

Para reproducir otra de las alteraciones de la IC, se elevaron los niveles de Na^+_i utilizando el inhibidor de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, ouabaína o el ionóforo de Na^+ , monensina. La administración de 10 μM de ouabaína o 2 μM de monensina durante 20 minutos produjo una respuesta inotrópica positiva estable e incrementó aproximadamente en 10 mM la $[\text{Na}^+_i]$, comparable al aumento que se ha descrito para la IC (Pieske, 2003; Mills, 2006) (Figura 26 A). En forma similar a lo que ocurre en la IC, estas drogas inducen no sólo la elevación del Na^+_i , sino que también incrementan el Ca^{2+}_i diastólico (figura 26 B) (Pieske, 2003). Como ya se había mencionado, la regulación del Ca^{2+} está íntimamente relacionada con la homeostasis del Na^+ , ya que una de las

principales vías de extrusión del Ca^{2+} es a través del NCX, el cual es regulado por el gradiente electroquímico del Na^+ (para rev. ver Blaustein, 1999). La tabla 1 muestra el efecto de estas drogas sobre la contractilidad basal y su cinética. En la figura 26 (C) se puede observar que al aumentar la frecuencia de estimulación en las células tratadas con ouabaina o monensina la relación acortamiento-frecuencia permanece positiva, aún con los niveles de Na^+ y Ca^{2+} elevados. Esto indica, que el aumento de Na^+ por sí solo, no es suficiente para producir la escalera negativa del corazón insuficiente.

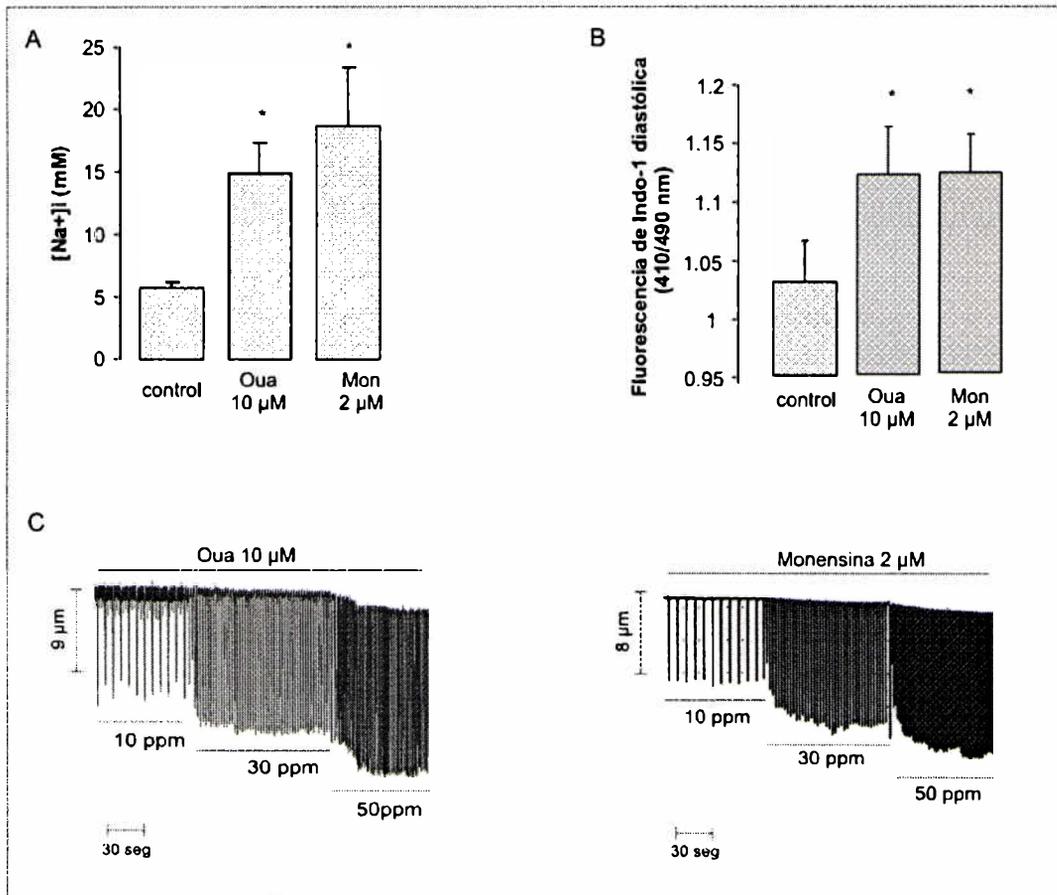


Figura 26. Influencia del aumento de Na^+_i en la relación acortamiento-frecuencia. Los niveles de Na^+ y Ca^{2+} diastólicos fueron medidos en miocitos aislados de gato cargados con SBF1 o Indo-1, respectivamente y mantenidos a una frecuencia de 10 pulsos por minuto (ppm). Tanto el bloqueante de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, como el ionóforo de Na^+ producen un incremento significativo en el Na^+_i (A) y el Ca^{2+} diastólico (B). * $P < 0.05$ respecto al control. Registros continuos de longitud celular luego de la perfusión con ouabaina y monensina, respectivamente (C). El incremento en el Na^+_i y el Ca^{2+} diastólico no inducen una relación acortamiento-frecuencia negativa a las frecuencias estudiadas.

1.4 Efecto de la sobreexpresión del NCX sobre la relación acortamiento-frecuencia.

Para estudiar otra de las alteraciones descritas en la IC, se sobreexpresó el NCX utilizando tecnología de transferencia génica mediada por adenovirus. La figura 27 muestra que el 100% de los miocitos de gato adulto que fueron infectados con un MOI de 100 con virus Ad. β gal o Ad.NCX mostraron una robusta expresión del gen marcador de GFP detectado a través de fluorescencia GFP (figura 27). Se utilizó western blot para cuantificar el incremento en el grado de expresión del NCX en los miocitos transfectados con AdNCX y encontramos que el incremento fue de $42\pm 2\%$ ($n=3$, de 3 corazones), expresado como niveles de NCX respecto a los niveles de NCX en células que sobreexpresan β gal (figura 27 panel inferior). Los niveles de SERCA2a y calsecuestrina permanecieron sin cambios.

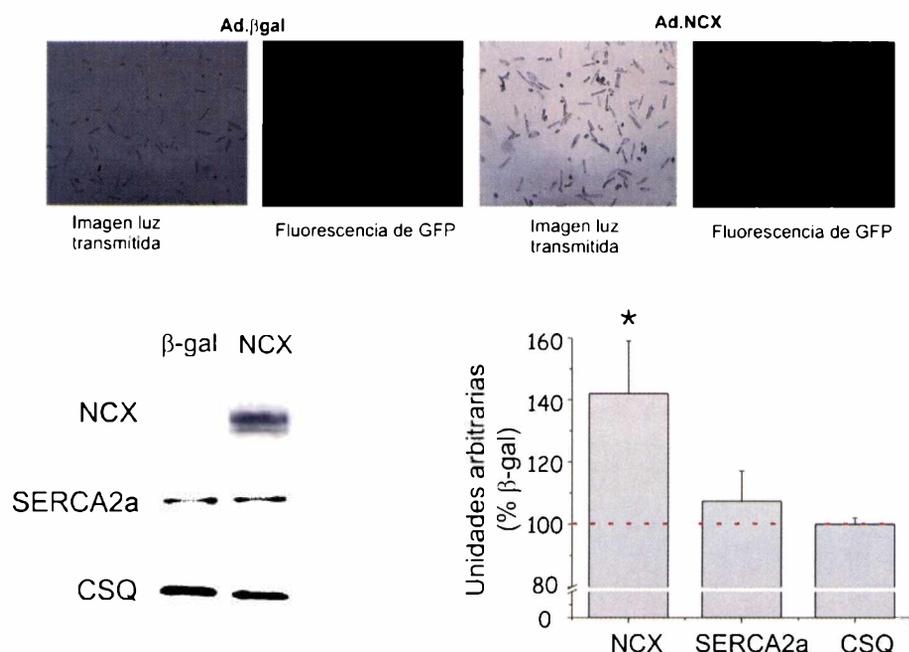


Figura 27: Nivel de sobreexpresión del NCX. El panel superior muestra la eficiencia de infección evaluada a través de la detección de GFP en miocitos cultivados e infectados con ad. β -gal o con ad.NCX. Las fotos fueron tomadas luego de 48 hs de infección y se puede observar que aproximadamente el 100% de los miocitos expresaron GFP, indicándonos la coexpresión de β -gal o del NCX. El panel inferior muestra un western blot representativo y los resultados promedio ($n=6$) que indicaron un aumento significativo en los niveles del NCX en las células infectadas con Ad.NCX respecto a las infectadas con Ad. β -gal. * $p<0.05$ respecto a las células que sobreexpresan β gal.

El efecto de la sobreexpresión del NCX sobre la actividad del modo directo del NCX se midió a través de parámetros de relajación. En este caso se utilizó el tiempo hasta la mitad de la relajación del transitorio de Ca^{2+} ($t_{1/2}$) inducido por un pulso de cafeína (Vila Petroff, 2003). Dado que la cafeína inhibe la retoma de Ca^{2+} por el RS, durante un pulso de cafeína, la fase de relajación del transitorio de Ca^{2+} es casi enteramente debida a la extrusión del ión por el modo directo del NCX (Puglisi, 1996). La figura 28 muestra los trazos normalizados del transitorio de Ca^{2+} inducido por un pulso de cafeína. Los miocitos que sobreexpresan el NCX tienen mayor velocidad de relajación del transitorio de Ca^{2+} (o menor $t_{1/2}$) que los miocitos infectados con Ad. β gal. Los gráficos de barras muestran los resultados promedios de estos experimentos. Esta disminución significativa del $t_{1/2}$ indica una actividad aumentada del intercambiador en los miocitos que sobreexpresan el NCX respecto a los controles (β gal).

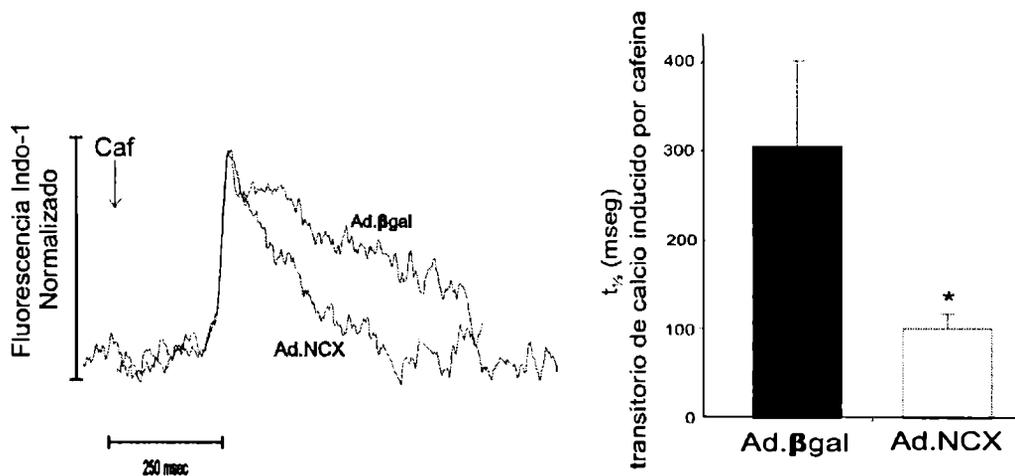


Figura 28. Efecto de la sobreexpresión del NCX sobre los transitorios de Ca^{2+} inducidos por cafeína. Trazos superpuestos y normalizados de transitorios de Ca^{2+} mostrando una mayor velocidad de caída del transitorio de Ca^{2+} en los miocitos que sobreexpresan el NCX ($n=6$), indicando en estos una mayor actividad del NCX, respecto a los que sobreexpresan β gal ($n=15$). A la derecha se muestran los resultados promedio de estos experimentos. * $p < 0.05$ con respecto a Ad. β gal

Una vez que se comprobó la mayor expresión y actividad del NCX, utilizamos los miocitos transfectados para evaluar su efecto sobre la relación acortamiento-frecuencia. Los parámetros de contractilidad basal y su cinética se resumen en la tabla 1.

La figura 29 muestra que el efecto inotrópico positivo producido por un aumento en la frecuencia de estimulación está presente tanto en los miocitos que sobreexpresan la β -galactosidasa como en los que sobreexpresan el NCX.

Estos resultados indican que el incremento en los niveles del NCX no es suficiente para producir la escalera negativa de la IC.

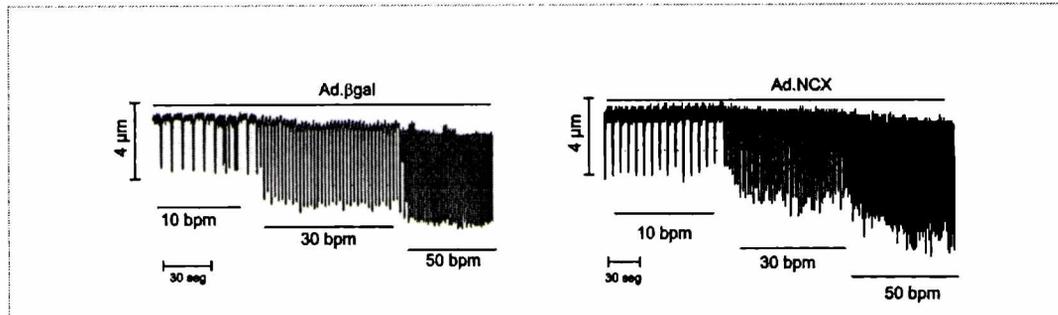


Figura 29. *Relación acortamiento-frecuencia positiva en miocitos que sobreexpresan el NCX.* Registros continuos típicos de acortamiento celular a las frecuencias indicadas en la figura (pulsos/minuto) en células que sobreexpresan la β -galactosidasa y el NCX. El aumento en la frecuencia de estimulación provoca un incremento en la amplitud de contracción tanto en las células Ad.βgal como en las Ad.NCX.

1.5 Combinación múltiple de las alteraciones básicas del manejo del Ca^{2+} y su influencia sobre la inducción de la escalera negativa

Los resultados presentados hasta aquí mostraron que ni la modulación de la actividad de la SERCA2a, ni los niveles de Na^+ , o de expresión del NCX separadamente, fueron capaces de transformar la escalera positiva en negativa. En vista de esos resultados se evaluaron diferentes combinaciones de estas alteraciones, para estudiar su efecto sobre la relación acortamiento-frecuencia.

1.5.1 Miocitos tratados con 10 μM de ouabaína y 1 μM de Tg

Con el objetivo de evaluar el efecto del alto Na^+ y la actividad de la SERCA2a disminuida en forma conjunta, se incubaron los miocitos con 10 μM de ouabaína y 1 μM de Tg. Los registros continuos de longitud celular a las frecuencias indicadas en la figura 30 muestran que la relación acortamiento-frecuencia positiva se mantiene a frecuencias bajas cuando las células son tratadas simultáneamente con Tg y ouabaína. Sin embargo se puede observar que cuando la frecuencia de estimulación pasa de 30 ppm a 50 ppm se produce una disminución en la amplitud de la contracción, es decir una

escalera negativa. Este experimento indica que la escalera negativa se hace evidente en estas condiciones sólo a altas frecuencias de estimulación.

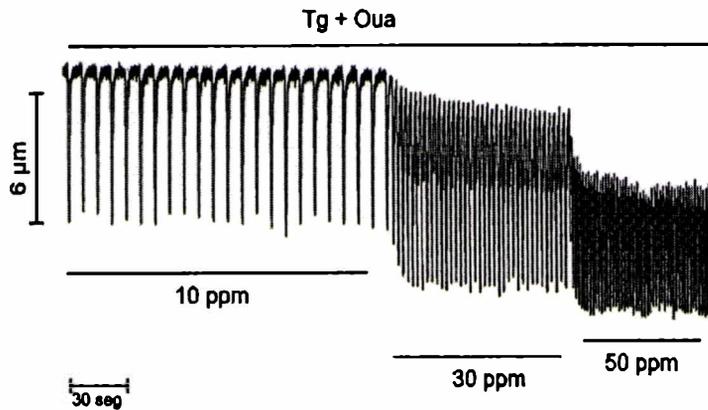


Figura 30. Inducción de una relación acortamiento-frecuencia negativa a altas frecuencias de estimulación en células tratadas con Tg + Oua. Registro continuo de longitud celular a las frecuencias indicadas en la figura. Los miocitos tratados simultáneamente con Tg + Oua tienen una relación acortamiento-frecuencia positiva a 10 ppm y 30 ppm, volviéndose negativa a 50 ppm.

1.5.2 Miocitos tratados con 10 μM de ouabaína e infectados con Ad.NCX.

Con el objetivo de evaluar la contribución relativa de los niveles altos de Na^+ y del NCX, miocitos cultivados e infectados con Ad.NCX se incubaron con 10 μM de ouabaína. La figura 31 muestra los registros continuos de acortamiento celular a las frecuencias indicadas en la figura, donde se puede observar que la relación acortamiento-frecuencia se transforma en negativa sólo a altas frecuencias de estimulación (50 ppm).

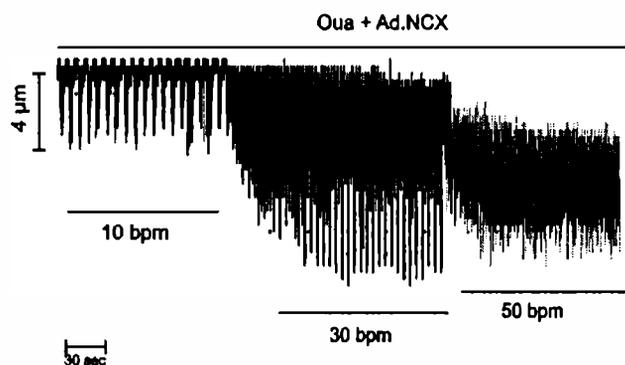


Figura 31. Inducción de una escalera negativa a altas frecuencias de estimulación cuando se sobreexpresa el NCX en un marco de Na^+ elevado. Registro continuo de longitud celular. Miocitos cultivados e infectados con Ad.NCX y tratados con Ouabaína tienen una relación acortamiento-frecuencia positiva a 10 ppm y 30 ppm, volviéndose negativa a 50 ppm.

1.5.3 Miocitos cultivados e infectados con Ad.NCX e incubados con 1 μ M de tapsigargina

Para evaluar la contribución relativa de los niveles altos del NCX y de una actividad disminuída de la SERCA2a, miocitos cultivados e infectados con Ad.NCX se incubaron con 1 μ M de Tg. La figura 32 muestra los registros continuos de longitud celular a las frecuencias indicadas en la figura, donde se puede observar, al igual que en los experimentos anteriores, que la escalera se torna negativa sólo a altas frecuencias de estimulación (50 ppm).

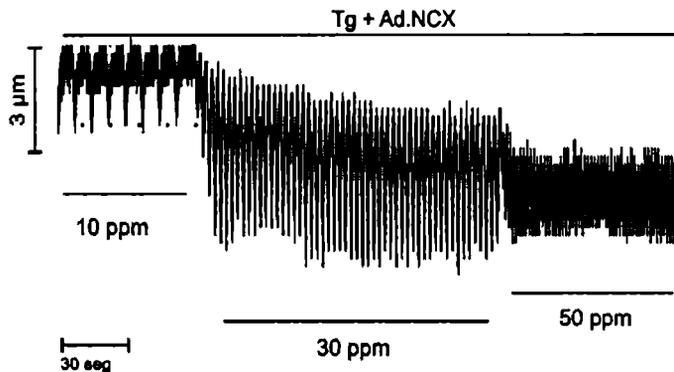


Figura 32. Inducción de una relación acortamiento-frecuencia negativa a altas frecuencias de estimulación en células que sobreexpresan el NCX y tienen la SERCA2a inhibida. Registro continuo de longitud celular a las frecuencias indicadas en la figura. Los miocitos cultivados e infectados con Ad.NCX tratados con Tg tienen una relación acortamiento-frecuencia positiva a 10 ppm y 30 ppm, y volviéndose negativa a 50 ppm.

1.5.4 Miocitos cultivados e infectados con Ad.NCX y tratados con 10 μ M de ouabaína y 1 μ M de tapsigargina

Con el objetivo de evaluar las tres alteraciones actuando simultáneamente, miocitos cultivados e infectados con Ad.NCX se incubaron con ouabaína y tapsigargina. La figura 33 muestra un registro continuo de un miocito a las frecuencias indicadas en la figura, donde podemos observar que la relación acortamiento-frecuencia se tornó negativa incluso a frecuencias bajas de estimulación.

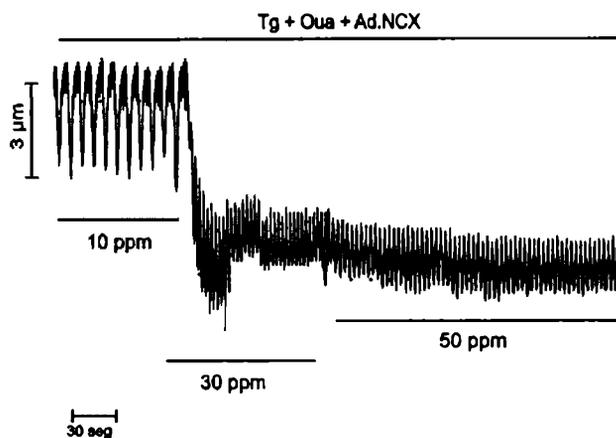


Figura 33. *Inhibir la SERCA2a, incrementar el Na^+ y la expresión del NCX simultáneamente recapitulan la escalera negativa característica del corazón insuficiente. Registro continuo de longitud celular a las frecuencias indicadas en la figura, donde se observa que cuando las tres alteraciones ocurren simultáneamente la relación acortamiento-frecuencia se torna negativa aun a bajas frecuencias de estimulación.*

Los resultados presentados en la figura 34 muestran además que cuando las tres alteraciones ocurren simultáneamente no sólo la relación acortamiento-frecuencia se torna negativa, sino que también se mimetiza el fenotipo contráctil del corazón insuficiente, es decir, la fracción de acortamiento disminuye, disminuye la longitud celular de reposo y se prolonga la relajación, validando el uso de estas intervenciones para obtener un modelo celular de IC donde se pueden estudiar en un sistema simplificado, los mecanismos subcelulares involucrados en la disfunción contráctil del corazón insuficiente.

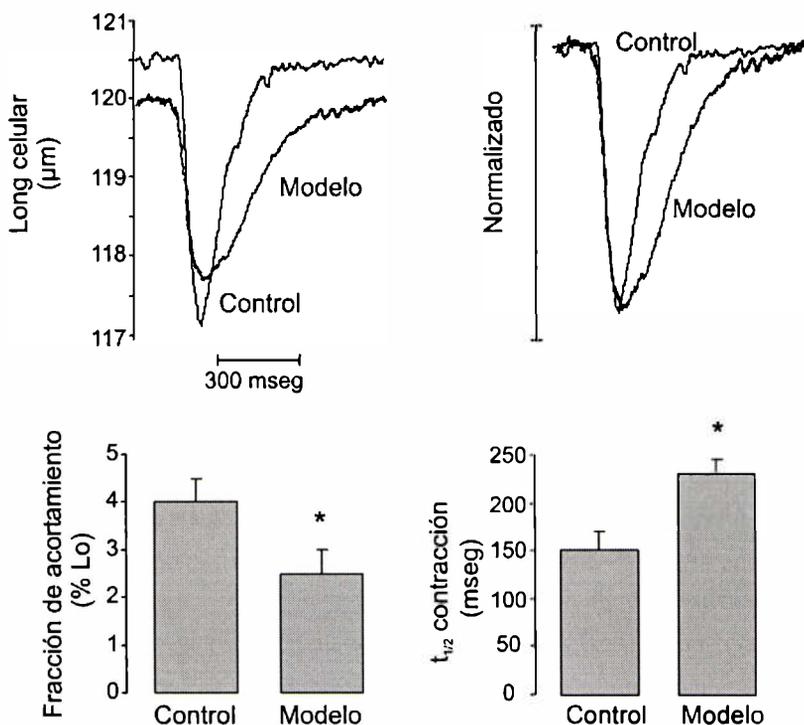


Figura 34. Efecto de las alteraciones de los mecanismos básicos del AEC sobre la contractilidad basal. Panel superior: trazos típicos de contracciones individuales de miocitos infectados con Ad.βgal (control) y de miocitos infectados con Ad.NCX e incubados con taspigargina + ouabaina (modelo), estimulados a 10 pulsos/minuto (ppm). Los miocitos del “modelo insuficiente” muestran una fracción de acortamiento reducida, una disminución de la longitud celular de reposo y un tiempo de relajación prolongado. Panel inferior: los gráficos de barras muestran los datos promedios de la fracción de acortamiento y del tiempo a la mitad del transitorio de Ca^{2+} ($t_{1/2}$) de células control y de células del modelo insuficiente. * $P < 0.05$ respecto del control.

Estos resultados indicarían que al menos en el miocardio de gato, el manejo del Ca^{2+} tiene que estar alterado en varios niveles para convertir la escalera positiva de los miocitos sanos, en la escalera negativa característica del corazón insuficiente.

En la figura 35 se pueden observar todos los resultados promedios de los experimentos funcionales mostrados hasta aquí.

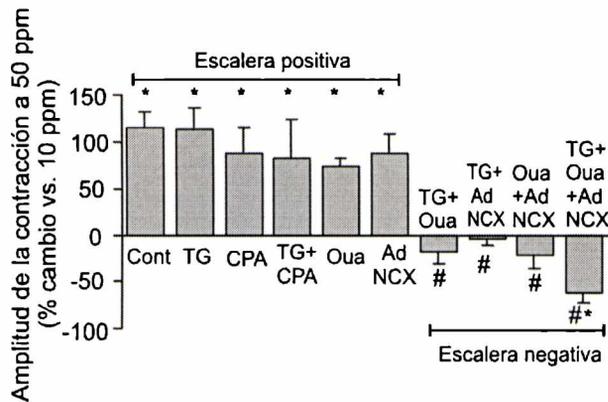
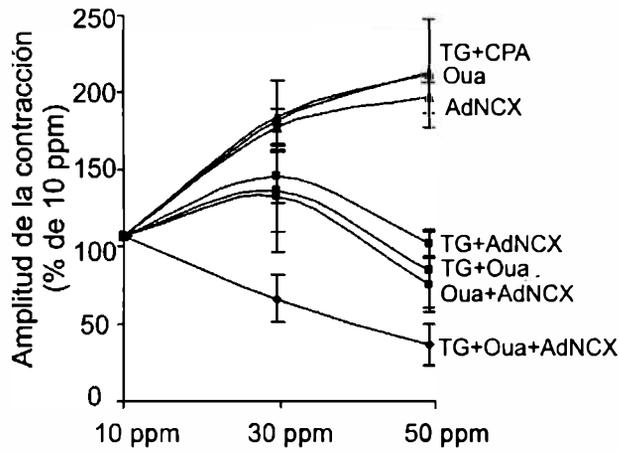


Figura 35. Efecto de las distintas intervenciones sobre la amplitud de contracción a distintas frecuencias de estimulación. Datos promedio de todos los experimentos funcionales presentados hasta aquí. La amplitud de la contracción se incrementa con el incremento en la frecuencia de estimulación (ppm, pulsos/minuto) cuando las células son tratadas con tapsigargina (Tg) o ácido ciclopiazónico (CPA); con ouabaína o después de la infección de los miocitos con Ad.NCX. Cuando dos de las alteraciones del Ca^{2+} son combinadas (Ad.NCX + TG, n=4; TG + oua, n=7; Ad.NCX + oua, n=4) la relación acortamiento-frecuencia se torna negativa a altas frecuencias de estimulación. Cuando las tres intervenciones son combinadas (n=5) la relación acortamiento-frecuencia se vuelve negativa aun a bajas frecuencias de estimulación. Los datos son expresados como porcentaje de incremento en la amplitud de la contracción con respecto a 10 ppm (arriba) o como porcentaje de cambio de la amplitud de contracción a 50 ppm vs. 10 ppm. * $P < 0.05$ respecto a la amplitud de contracción a 10 ppm. # $P < 0.05$ respecto a los grupos con relación acortamiento-frecuencia positiva.

Tabla 1. Efecto de las diferentes intervenciones sobre la longitud inicial y parámetros de contracción y relajación de los miocitos aislados de gato.

		Lo (μm)	AC (% de Lo)	$t_{1/2}$ (ms)	n
1 μM TG	Pre	126 \pm 6	4.6 \pm 0.5	143 \pm 10	8
	Post	126 \pm 7	3.6 \pm 0.5*	206 \pm 16*	8
10 μM CPA	Pre	125 \pm 7	4.0 \pm 0.4	150 \pm 12	6
	Post	126 \pm 7	3.8 \pm 0.6	210 \pm 11*	6
10 μM oua	Pre	130 \pm 8	5.0 \pm 1.0	141 \pm 9	11
	Post	128 \pm 6	10.5 \pm 1.5*	148 \pm 7	11
2 μM monensina	Pre	120 \pm 5	4.0 \pm 0.8	157 \pm 10	5
	Post	118 \pm 4	8.0 \pm 1.2*	162 \pm 9	5
Adenovirus	Ad.GFP 100 MOI	115 \pm 7	2.3 \pm 0.5	144 \pm 4	15
	Ad.NCX 100 MOI	121 \pm 9	3.0 \pm 0.8	143 \pm 10	6
	Ad.siRNA.SERC A2a 400 MOI	119 \pm 5	2.1 \pm 0.4	258 \pm 2*	12

TG, tapsigargina; CPA, ácido ciclopiazónico, Lo, longitud diastólica basal; AC, acortamiento, $t_{1/2}$, tiempo a la mitad de la relajación de la contracción. Pre. y Post., mediciones antes y después de la intervención. Valores obtenidos a 10 ppm.

* Significativo vs antes de la intervención ($p < 0.05$)

2. RESULTADOS PARTE 2

Dado que la disfunción contráctil que se observa en el corazón insuficiente no sólo se debe a alteraciones en el manejo del Ca^+ , sino que además se debe a la pérdida de unidades contráctiles por apoptosis, a continuación se examinó el efecto del Na^+ elevado sobre la viabilidad celular y la apoptosis. Nos concentramos en el rol de esta alteración en particular dado que, como se mencionó previamente, el aumento de la actividad de la SERCA2a y no su disminución, y la disminución de la expresión del NCX y no su sobreexpresión (como ocurre en la IC) han sido relacionados con apoptosis.

2.1 Efecto de la elevación del Na^+ sobre la viabilidad celular

Para estudiar el efecto del alto Na^+ sobre la viabilidad celular y apoptosis, empleamos la estrategia de inhibir a la bomba Na^+/K^+ ATPasa con el glucósido cardiotónico ouabaína. Utilizamos miocitos de gato y rata que poseen diferente sensibilidad a los digitálicos. Inicialmente, realizamos una curva dosis-respuesta para estudiar el efecto de la ouabaína en la viabilidad celular de gato. Como se observa en la figura 36 el cultivo de células de gato con 100 nM de ouabaína durante 24 hs redujo la viabilidad $82 \pm 6\%$, en tanto que 50 y 25 nM de ouabaína produjeron una reducción de $58 \pm 8\%$ y $45 \pm 5\%$, respectivamente. Como se detalló en la parte de métodos, las células viables son las que poseen forma alargada, mientras que las no viables son las redondeadas.

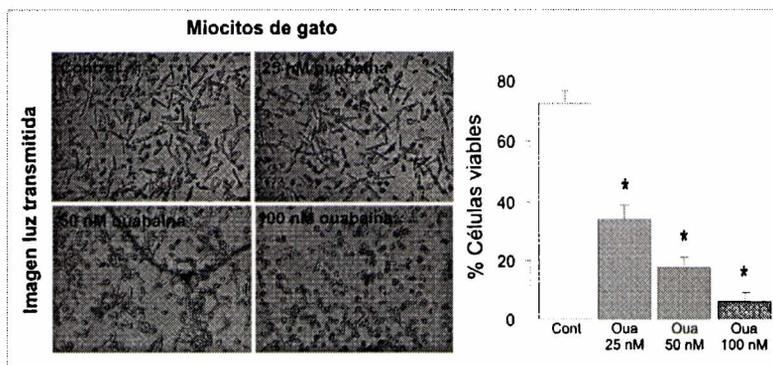


Figura 36. Curva dosis-respuesta del efecto de la ouabaina sobre la viabilidad celular. Fotografías representativas y resultados promedio mostrando el efecto del incremento de la concentración de ouabaina sobre la viabilidad de los miocitos de gato. * $p < 0.05$ con respecto al control.

Cuando se probó el efecto de la ouabaina sobre los miocitos de rata, una especie con menor sensibilidad a la misma, se observó que se necesitaba $2 \mu\text{M}$ del glucósido cardiotónico para obtener una disminución en la viabilidad similar a la obtenida con 25 nM en el gato ($43 \pm 5 \%$) (figura 37).

Los experimentos subsiguientes se realizaron en miocitos de rata ya que esta especie es de más fácil manipulación para el aislamiento de los miocitos. Se utilizaron $2 \mu\text{M}$ de ouabaina (que produce el mismo efecto sobre la viabilidad celular que 25 nM de ouabaina en el gato). Esta dosis, como se describió más arriba, (al inhibir la bomba Na^+/K^+ ATPasa) produce un moderado aumento de $[\text{Na}^+]_i$ (aproximadamente 8 mM) que resultaría en un aumento del Ca^{2+}_i a través del NCX funcionando en modo reverso (Terada, 1994; Bers, 2001)

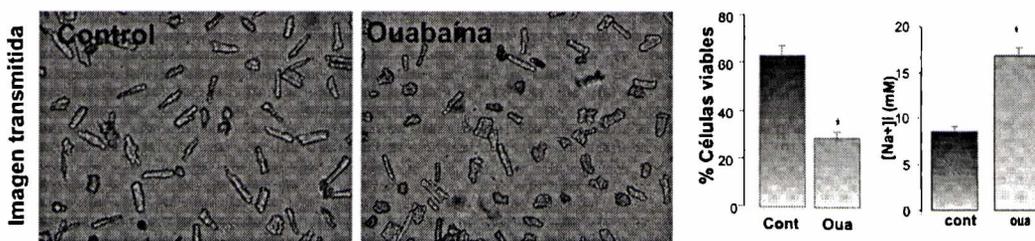


Figura 37. La ouabaina disminuye la viabilidad celular. Fotos representativas de imágenes obtenidas con microscopio de luz transmitida y sus respectivos promedios mostrando que el número de células viables disminuyó significativamente luego del cultivo con $2 \mu\text{M}$ de ouabaina ($n=5$). También se muestran datos promedio de los valores de la $[\text{Na}^+]_i$ en miocitos cultivados con ouabaina y en situación control ($n=4$). Los datos son expresados como la media \pm el S.E.M. * $p < 0.05$ con respecto al control.

Para corroborar si el efecto observado de la ouabaína sobre la viabilidad celular era un efecto inespecífico de la ouabaína y no por su acción específica de inhibir la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, se repitieron los experimentos utilizando otro glucósido cardiotónico, la digoxina, un cardiotónico ampliamente utilizado en la clínica médica. Se utilizó $1\ \mu\text{M}$ de digoxina. La figura 38 muestra similares efectos sobre la viabilidad celular en miocitos de rata cultivados 24 hs con $1\ \mu\text{M}$ de digoxina (la viabilidad celular se reduce $39\pm 6\%$).

Esos resultados muestran que la inhibición crónica de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, con dosis no tóxicas de digitálicos producen muerte celular.

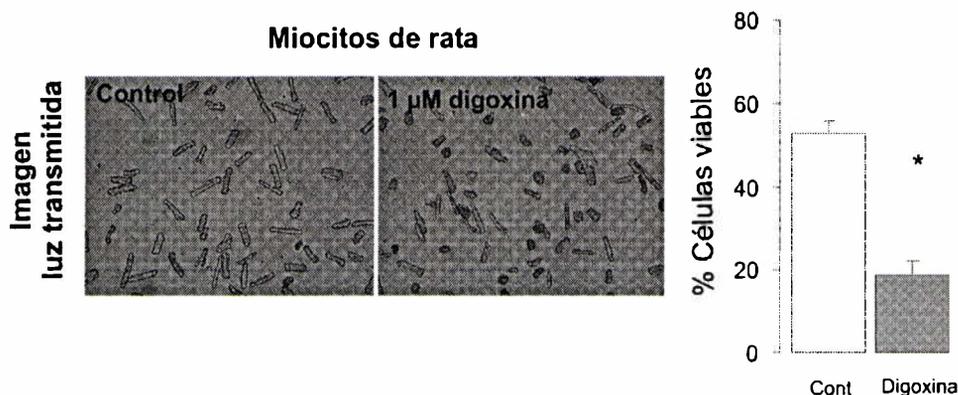


Figura 38. Efecto de la digoxina sobre la viabilidad celular. Fotografías representativas y resultados promedio que muestran el efecto de $1\ \mu\text{M}$ de digoxina sobre la viabilidad celular de miocitos de rata ($n=5$). El cultivo durante 24 hrs con $1\ \mu\text{M}$ de digoxina redujo la viabilidad a un $39\pm 6\%$. $P<0.05$.

2.2 Mecanismos de muerte celular

Con el objetivo de estudiar cuál es el mecanismo de muerte por el cual mueren los miocitos, y sabiendo que la administración de dosis tóxicas y agudas de digitálicos producen muerte celular por apoptosis en el corazón (Ramírez y Ortega, 2007), se estudiaron diferentes pasos críticos de la apoptosis, tales como la actividad de la casapa-3 y el cociente entre la proteína apoptótica Bax y la antiapoptótica Bcl-2, en los cultivos de miocitos de rata incubados 24 hs con $2\ \mu\text{M}$ de ouabaína. En la figura 39 se muestran fotos representativas de imágenes de microscopio de fluorescencia y sus resultados promedio, donde se observa que los cultivos tratados con ouabaína tienen un incremento significativo de la actividad de las caspasa-3 y en la figura 40 se observa un aumento del cociente Bax/Bcl-2. Estos resultados indican que el tratamiento de

los miocitos con una concentración de ouabaína que produce un aumento de Na^+_i , de aproximadamente 8 mM, induce muerte celular, al menos en parte, debido a que promueve apoptosis. Esto podría sugerir que la pérdida de unidades contráctiles observada en la IC podría ser debida a la apoptosis y causada por una elevación crónica de la $[\text{Na}^+]_i$.

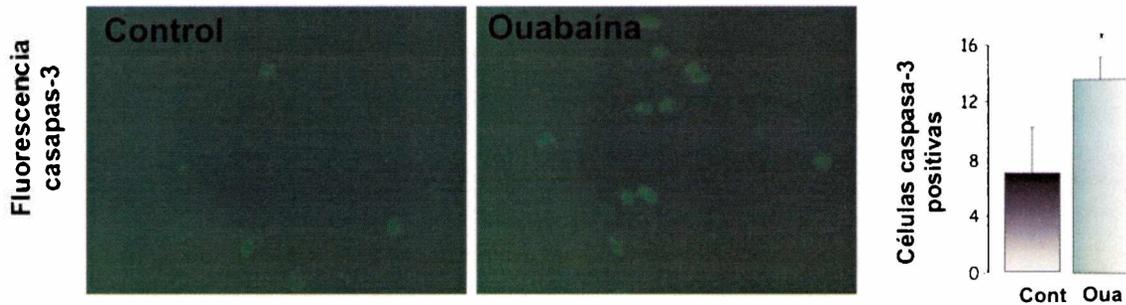


Figura 39. La ouabaína induce la activación de la caspasa-3. Imágenes de fotografías de microscopía de fluorescencia donde se puede observar que en los cultivos tratados con ouabaína hay mayor cantidad de células caspasa-3 positivas, lo que indicaría una mayor actividad de las caspasa-3. (n=5) * $p < 0.05$ con respecto al control.

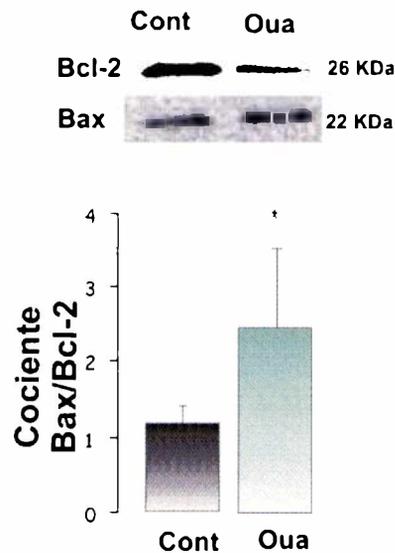


Figura 40. La ouabaína aumenta el cociente Bax/Bcl-2. Expresión de Bax y Bcl-2. Blot representativo de la detección inmunológica de Bax y Bcl-2. El tratamiento con ouabaína aumenta la relación Bax/Bcl-2, lo que indica una mayor propensión de los miocitos a la apoptosis. * $p < 0.05$ con respecto al control.

2.3 Estudio de los segundos mensajeros involucrados en la cascada apoptótica inducida por la ouabaína

Los resultados presentados hasta aquí mostraron que en miocitos cultivados 24 horas, la inhibición de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ con el uso de digitálicos produjo apoptosis asociada a un aumento del Na^+_i . Los siguientes experimentos fueron diseñados para dilucidar cuáles son los segundos mensajeros involucrados en esta cascada.

2.3.1 Inhibición del modo reverso del NCX

Como se mencionó anteriormente, el aumento de Na^+ producido por el bloqueo de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ produce un aumento de Ca^{2+} a través del NCX (Terada, 1994; Bers, 2001). Está descrito que el bloqueo del modo reverso del NCX con KB-R7947 (KBR) previene los efectos arritmogénicos asociados con la toxicidad de los digitálicos (Satoh, 2000) y evidencia reciente de nuestro laboratorio y de otros grupos de trabajo, muestra que el Ca^{2+} que entra a través del NCX está involucrado en la cascada apoptótica (Miyamoto, 2005; Vila-Petroff, 2007). Con el propósito de demostrar que la elevación de la $[\text{Na}^+]_i$ producida por el bloqueo de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, produce un aumento de Ca^{2+} que entra a través del NCX funcionando en modo reverso y que este Ca^{2+} está involucrado en la cascada apoptótica; se cultivaron miocitos durante 24 horas en presencia de $2\ \mu\text{M}$ de ouabaína y en presencia de $2\ \mu\text{M}$ de ouabaína más $5\ \mu\text{M}$ del inhibidor del modo reverso del NCX, KBR. Como se observa en las fotografías de luz transmitida de la figura 41, la disminución en la viabilidad celular pudo ser prevenida con $5\ \mu\text{M}$ de KBR. Cuando se midió la actividad de la caspasa-3 se observó que la apoptosis inducida por ouabaína también fue prevenida por KBR (figura 41).

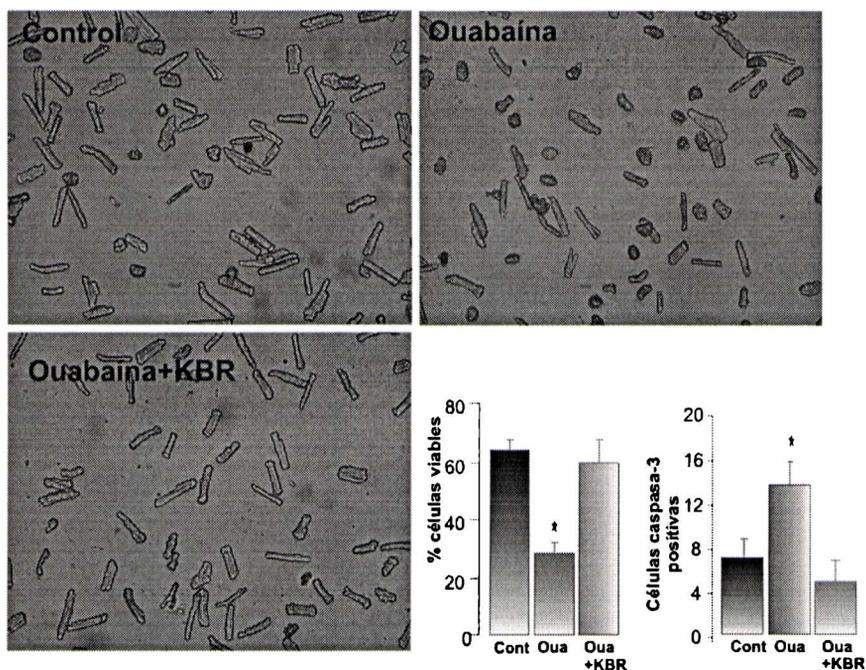


Figura 41. Efecto del KBR sobre la viabilidad y apoptosis de los miocitos. Imágenes representativas de microscopio de luz transmitida, de miocitos en situación control (Cont) y de miocitos tratados con ouabaína (Oua) y tratados con ouabaína más 5 μM de inhibidor específico del modo reverso del NCX, KB-R7947 (KBR). Las imágenes muestran claramente numerosas células no viables de forma redondeada en los cultivos tratados con ouabaína y que el KBR previno esta situación. Los gráficos de barras muestran los resultados promedio de estos experimentos de viabilidad celular y de los datos promedio de la actividad de caspasa-3. La actividad de la caspasa-3 se encontró aumentada en los cultivos con ouabaína y esta situación fué revertida con KBR. Los datos son la media \pm SEM de 5 experimentos independientes usando células de 5 corazones. * $p < 0.05$ con respecto al control.

Estos resultados indican que el influjo de Ca^{2+} a través del NCX funcionando en modo reverso, es un componente clave en la ruta de señalización iniciada por el aumento crónico de Na^+ y que lleva a la muerte celular.

Además estos resultados nos permitieron asegurar que la ruta de señalización apoptótica inducida por la ouabaína es mediada por el aumento de Na^+ .

2.3.2 Estudio del rol de la proteína quinasa Ca^{2+} /calmodulina-dependiente (CaMKII) en la cascada apoptótica

En un trabajo previo de nuestro laboratorio demostramos que la activación de la CaMKII producida por el influjo de Ca^{2+} a través del NCX, es un paso crucial en la muerte celular y apoptosis inducida por isquemia y reperfusión (Vila-Petroff 2007). También se ha vinculado a la CaMKII con la apoptosis en

corazones bajo estimulación beta1-adrenérgica (Zhu, 2003). Con estos antecedentes, se evaluó el rol de la CaMKII en la muerte celular y en la cascada apoptótica inducida por la elevación de la $[Na^+]_i$. Para cumplir con este objetivo, se utilizaron dos estrategias: 1) se cultivaron miocitos de rata con 2 μ M de ouabaina en presencia y ausencia de 1 μ M del inhibidor de la CaMKII, KN-93 (KN) y de otro inhibidor más específico de la misma, AIP (péptido inhibidor de la CaMKII), 2) se utilizó tecnología de transferencia génica para sobreexpresar la CaMKII (Ad.CaMKII) en cultivos de miocitos de rata. En esta última serie de experimentos, se sobreexpresó la β -galactosidasa (Ad. β gal) como grupo control.

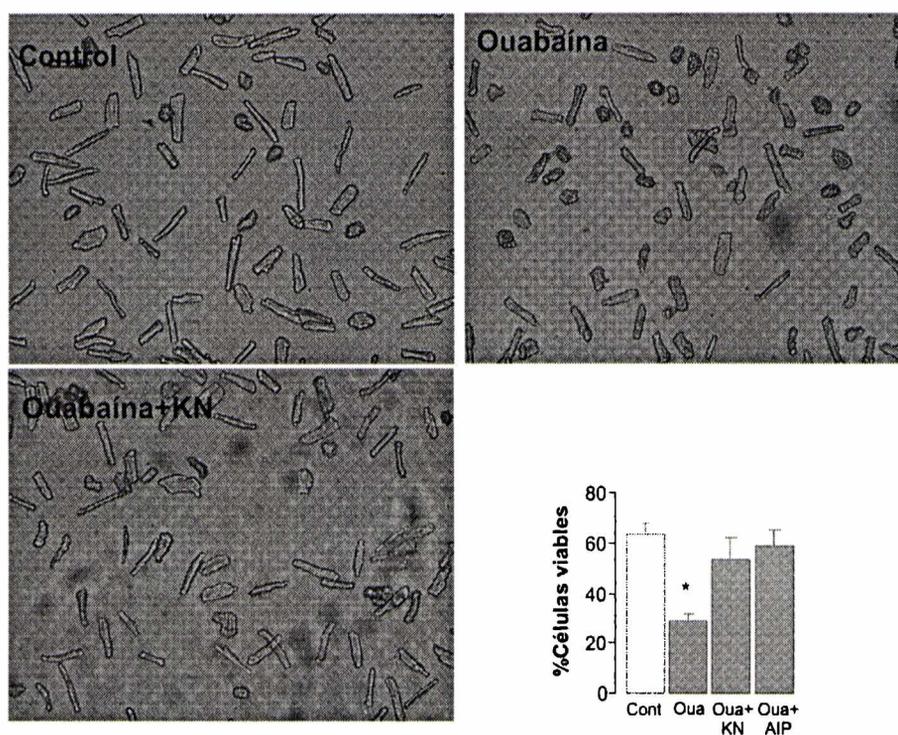


Figura 42. Efecto del KN-93 (KN) y AIP sobre la viabilidad celular. Imágenes representativas obtenidas con microscopio de luz transmitida de miocitos en situación control (Cont), de miocitos tratados con ouabaina (Oua) o tratados con ouabaina más el inhibidor de la CaMKII KN ($n=5$). Estas imágenes claramente muestran que el KN fue capaz de prevenir la muerte celular inducida por ouabaina. Los gráficos de barras muestran los resultados promedio de estos experimentos; además, también se muestran resultados similares obtenidos cuando los miocitos fueron tratados con ouabaina más el inhibidor específico de la CaMKII, AIP. * $p < 0.05$ con respecto al control.

La figura 42 muestra que la inhibición de la CaMKII con KN y AIP proteje a los cardiomiocitos de la muerte celular inducida por la ouabaína, indicando que la CaMKII participa en la cascada de señalización hacia la muerte celular.

Con el propósito de estudiar si la CaMKII estaba involucrada en la muerte celular por apoptosis se realizaron western blots para medir el grado de expresión de las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas, Bax y Bcl-2. Como muestra la figura 43, KN-93 previno el incremento en el cociente Bax/Bcl-2, producido por el tratamiento con ouabaína. Indicando que la CaMKII está involucrada en la apoptosis inducida por la elevación de la $[Na^+]_i$.

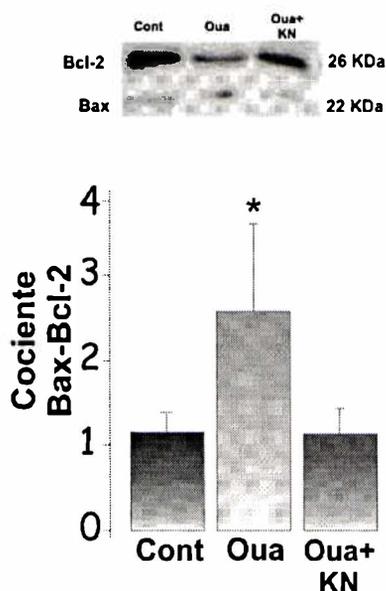


Figura 43. La ouabaína aumenta el cociente Bax-Bcl-2 y este efecto es revertido con KN. Expresión de Bax y Bcl-2. Blot representativo y resultados promedio de la detección inmunológica de Bax y Bcl-2. El tratamiento con ouabaína aumentó la relación Bax/Bcl-2, lo que indica una mayor propensión de los miocitos a la apoptosis. * $p < 0.05$ respecto a control y a Oua+KN.

Para confirmar el rol de la CaMKII en la muerte celular inducida por la ouabaína, se sobrepresó la CaMKII (Ad.CaMKII) y la β -galactosidasa (Ad. β gal) utilizando transferencia génica. Una vez confirmada la sobrepresión de estas proteínas a través de la visualización de la proteína fluorescente verde (GFP), se incubaron las células Ad. β gal y Ad.CaMKII con $2\mu M$ de ouabaína. En estas condiciones de CaMKII sobrepresada, la ouabaína indujo un mayor efecto deletereo. Como se puede observar en la figura 44, el número de células muertas en presencia de ouabaína fue significativamente mayor en los cultivos en los que se sobrepresó la CaMKII con respecto a aquellas en las que se

sobreexpresó la β -galactosidasa corroborando el rol fundamental de la CaMKII en la ruta de señalización hacia la muerte celular.

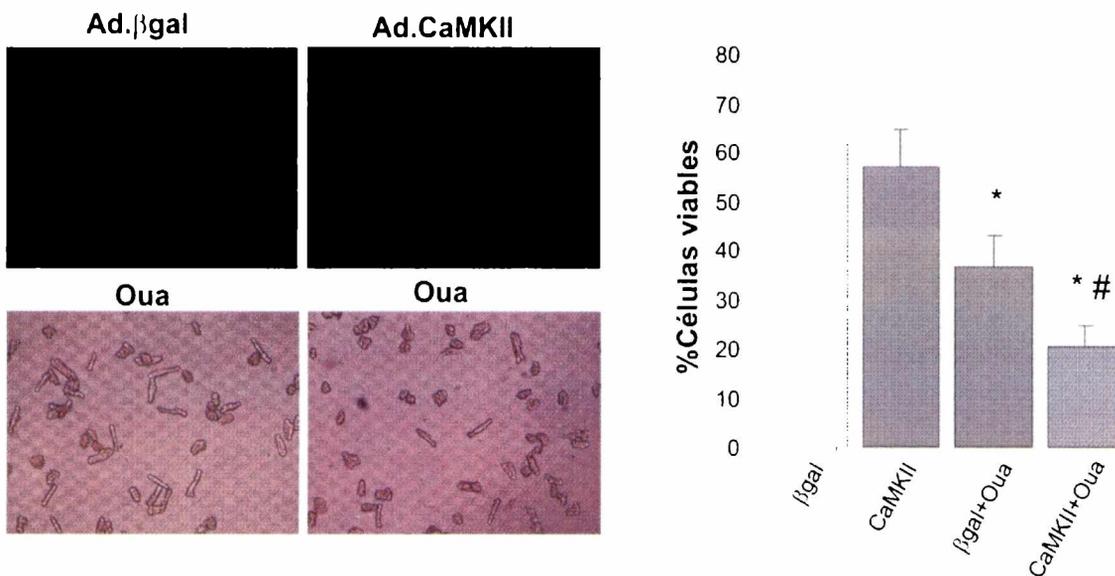


Figura 44. Estrategia de transferencia génica mediada por adenovirus. Fotografías representativas y resultados promedio de miocitos de rata transfectados con Ad. β gal o Ad.CaMKII. Las fotografías del panel superior muestran la fluorescencia de GFP, que indica la eficiencia de transfección. Las fotografías del panel inferior fueron obtenidas con el microscopio de luz transmitida, representando el efecto de la ouabaina en la viabilidad celular en los miocitos con sobreexpresión de β gal o de CaMKII. El gráfico de barras muestra los resultados promedio ($n=3$) de estos experimentos indicando que las células que sobreexpresaron la CaMKII fueron más susceptibles al efecto deletéreo de la ouabaina que las células que sobreexpresaron β gal. * $p<0.05$ vs. Control. # $p<0.05$ vs. ouabaina en células que sobreexpresan β gal.

DISCUSIÓN

La relación fuerza-frecuencia positiva o escalera positiva, es de suma importancia para incrementar el rendimiento cardíaco en respuesta a un aumento de la demanda sistémica. Esta propiedad intrínseca del corazón se pierde en el corazón insuficiente. En humanos, la insuficiencia cardíaca congestiva es el punto final de una suma de eventos que dañan el miocardio y culminan en una función inapropiada de la bomba cardíaca. Más allá de que existen continuos descubrimientos que tratan de explicar la naturaleza compleja de esta patología cardíaca, las alteraciones del Ca^{2+} intracelular han sido identificadas como una de las principales responsables de la disminución en la contractilidad y de la inversión de la escalera positiva en negativa. En particular la relación fuerza-frecuencia negativa ha sido atribuida independientemente, a tres principales alteraciones: una disminución en la expresión/actividad de la SERCA2a (Arai, 1994), un incremento en la expresión del NCX (Hasenfuss, 1999; Hobai, 2000; Pogwizd, 1999) y una elevada $[\text{Na}^+]_i$ (Despa, 2002; Mills, 2006). Estas alteraciones, aunque variables según el modelo experimental y el grado de IC han descritas en diferentes modelos animales de IC, así como en corazones humanos insuficientes (Hasenfuss, 2002). La presente tesis estuvo, en primer lugar, dirigida a intentar dilucidar si cada una de estas alteraciones era capaz de provocar por si misma la escalera negativa en miocitos sanos de gato y cuál era la contribución relativa de éstas al fenómeno de la escalera negativa. Los resultados indican que la alteración en uno solo de los tres niveles explorados en el manejo del Ca^{2+} no es suficiente para revertir el efecto inotrópico positivo producido por el incremento en la frecuencia de estimulación en miocitos sanos. Se necesitan las tres alteraciones actuando conjuntamente para producir la relación fuerza-frecuencia (acortamiento-frecuencia) negativa característica del corazón insuficiente.

En segundo lugar, nos propusimos dilucidar si existe alguna relación entre las alteraciones del AEC antes mencionadas y la apoptosis, que como ya se mencionó previamente, es una causa fundamental de la disminución de la contractilidad en la IC. Debido a que la disminución en la expresión del NCX (y no su aumento como ocurre en la IC) y la sobreexpresión de la SERCA2a (y no su disminución como ocurre en la IC) se asociaron previamente con la apoptosis

(Miyamoto, 2005; Vafiadaki, 2009) nos concentramos en el estudio del posible rol del aumento de Na^+ intracelular en la producción de este tipo de muerte celular.

1. LA ESCALERA NEGATIVA DE LA IC

1.1. El modelo

Una de las contribuciones más importantes de esta tesis, es quizás la obtención de un modelo que mimetiza a nivel celular el fenotipo de la IC. Las investigaciones previas acerca de los mecanismos subcelulares de la IC y del fenómeno de escalera negativa asociado a ella, se han focalizado en el estudio de sólo una de las alteraciones del manejo del Ca^+ intracelular mencionadas más arriba, intentando mejorarla y así restaurar la función perdida o alterada. En todos los casos se utilizó fundamentalmente tejidos provenientes de corazones insuficientes o diferentes modelos animales para realizar los ensayos (del Monte, 1999; Gray, 2001; Hobai, 2004). Este trabajo se ha aproximado al problema de forma diferente, utilizando miocitos sanos y reproduciendo en ellos cada una de las alteraciones del manejo del Ca^{2+} intracelular que han sido propuestas como mediadoras de la escalera negativa de la IC. Estas se fueron introduciendo secuencialmente una por vez en miocitos sanos, a través de diferentes estrategias. Utilizando este modelo celular simplificado se pudo controlar cada una de las alteraciones mencionadas y examinar su contribución relativa a una de las consecuencias más negativas del disturbio en el manejo del Ca^{2+} intracelular en la IC, la escalera negativa. Es importante enfatizar que el propósito de esta estrategia fue investigar si cada una de las alteraciones del Ca^{2+} descritas en el corazón insuficiente era capaz de recapitular por si misma la relación fuerza-frecuencia negativa de la IC. Para cumplir con este objetivo, se trató de mimetizar las situaciones más extremas observadas en la IC. Así como ha sido descrito que la disminución en la expresión de la SERCA2a varía entre un 20 y 80 % de acuerdo a diferentes estudios (Hasenfuss, 2002), en este trabajo se utilizó la máxima inhibición de la SERCA2a reportada. Similarmente, se mimetizó el máximo incremento de Na^+ descrito en la IC (Mills, 2006; Pieske, 2003). Con respecto al incremento en la expresión del NCX también se utilizó la máxima

expresión lograda en nuestros cultivos celulares que es la que se encuentra en los niveles más altos descritos para la IC (Pogwizd, 1999).

1.2. En miocitos sanos, alteraciones individuales en el manejo del Ca^{2+} no son suficientes para invertir la relación fuerza-frecuencia (acortamiento-frecuencia) positiva

Los resultados presentados, mostraron que las alteraciones en el manejo del Ca^{2+} producidas por la manipulación de tan sólo uno de los tres cambios característicos de la IC, no eran suficientes para inducir la relación acortamiento-frecuencia negativa. Es posible argumentar, que la falla en invertir la escalera positiva en los experimentos realizados, podría deberse a que la concentración de Tg utilizada para inhibir a la bomba de Ca^{2+} fue insuficiente, o que el aumento en la concentración de Na^+ y en los niveles de NCX fueron insuficientes. Sin embargo se realizaron exhaustivos experimentos controles, donde se determinaron cuáles eran las concentraciones de los diferentes compuestos usados para cada experimento. Así, con respecto a la inhibición de la SERCA2a, utilizamos diferentes estrategias para asegurar la correcta inhibición de la misma: 1) se utilizó en todos los experimentos 1 μM de Tg, concentración que, como se observa en la figura 22, logró inhibir casi completamente la retoma de Ca^{2+} por el RS; 2) se utilizó además, un segundo inhibidor de la SERCA2a, el CPA, en una dosis de 10 μM y 3) utilizamos tecnología de transferencia génica para disminuir la expresión de la SERCA2a a través de siRNA.SERCA2a. Es importante destacar que la inhibición de la SERCA2a a través de tecnología siRNA había sido usada con éxito por el grupo de Seth y colaboradores (Seth, 2004), en cardiomiocitos de ratas neonatas, pero sin resultados en cardiomiocitos adultos. En nuestro laboratorio se logró la puesta a punto de estos experimentos y el resultado fue exitoso en cardiomiocitos adultos, ya que se logró la inhibición en la expresión de la SERCA2a, evaluada por western blot. Además, con el objetivo de evaluar la carga del RS, a fin de constatar si éste estaba realmente deplecionado de Ca^{2+} , se indujo con cafeína un transitorio de Ca^{2+} en presencia de 1 μM de Tg. Como se observa en la figura 23, el transitorio no se produce en estas condiciones, lo que indica que el RS se encuentra deplecionado de Ca^{2+} . Estos resultados corroboran la efectividad de la Tg para inhibir la SERCA2a. Los resultados de

estas tesis mostraron que aun con la SERCA2a inhibida la relación acortamiento-frecuencia permanece positiva, coincidentemente con resultados anteriores de nuestro laboratorio (Vila Petroff, 2003) donde se mostró que la relación fuerza-frecuencia permanecía positiva, aún con una completa abolición del RS utilizando rianodina y TG. Los resultados de estas tesis muestran además que el incremento del Na^+_i en miocitos sanos, provocado por dos intervenciones diferentes (ouabaína y monensina) fue similar en ambos casos (aprox. 10 mM) (figura 26) y del orden de los aumentos observados en la IC (Pieske, 2003). Aunque se han descrito efectos tóxicos para la ouabaína (por ejemplo, arritmias), estos no se observaron en las condiciones experimentales utilizadas para los presentes experimentos. Sí se detectó un aumento del Ca^{2+}_i , que podría deberse probablemente al impacto del aumento del Na^+ sobre la actividad del NCX. La imposibilidad de invertir la relación acortamiento-frecuencia de positiva a negativa, utilizando dos herramientas farmacológicas diferentes para elevar el Na^+ intracelular, permitió tener un fuerte sustento para afirmar que el alto Na^+ por si mismo no es suficiente para producir la escalera negativa del corazón insuficiente. Con respecto al NCX, la manipulación del mismo por transferencia génica produjo un incremento de su expresión aproximadamente en un 50%, lo que reproduce cercanamente la situación descrita para la IC (Pogwizd, 2004). Además no sólo se indujo un aumento en su expresión, sino que también se produjo un aumento en la actividad del mismo intercambiador como se observa en la figura 28, donde se muestra que luego de un pulso de cafeína el $t_{1/2}$ de la relajación del transitorio de Ca^{2+} luego del pulso es menor en los miocitos infectados con ad.NCX. En estos miocitos en los que se aumentó la actividad y los niveles del NCX, tampoco se logró invertir la escalera positiva con el aumento de la frecuencia. Coincidentemente con estos hallazgos, estudios en ratones transgénicos con sobreexpresión del NCX muestran que estos no tienen signos de desarrollo de IC (Adachi-Akahane, 1997; Yao, 1998). Además el tratamiento de músculos papilares humanos no insuficientes con un activador de los canales de Na^+ (BDF 9148) y ouabaína, también fracasó en invertir o alterar la escalera positiva (Bavendiek, 1998).

1.3. Múltiples alteraciones determinan una relación fuerza-frecuencia (acortamiento-frecuencia) negativa

Los resultados de esta tesis mostraron que sólo cuando se produce una alteración simultánea en al menos de dos de las tres alteraciones más importantes en el manejo de Ca^{2+} intracelular, la relación acortamiento-frecuencia se vuelve negativa. Más aún, con la introducción de una tercera alteración disminuye aún más la frecuencia de estimulación a la cual la escalera se vuelve negativa (figura 33). Si bien la producción simultánea de dos de las alteraciones puede llevar a la escalera negativa a altas frecuencias de estimulación, sólo las tres alteraciones fueron capaces de negativizar la escalera en todo el rango de frecuencias estudiado.

Consistentemente con nuestras conclusiones, el corazón de los pequeños mamíferos como por ejemplo, el de rata y ratón, exhibe una relación fuerza-frecuencia negativa a pesar de poseer una robusta actividad de la SERCA2a (Bassani, 1994). La escalera negativa observada en los roedores podría deberse a un alto contenido de Ca^{2+} del RS que estaría impidiendo una mayor carga del mismo con el aumento de la frecuencia de estimulación (Shattock, 1989). La característica común exhibida por estos mamíferos es el alto contenido de Na^+ basal, el cual podría limitar la extrusión de Ca^{2+} a través del NCX incrementando el contenido de Ca^{2+} del RS, aún a bajas frecuencias de estimulación. Un alto contenido de Ca^{2+} del RS junto con una corta duración del potencial de acción en los miocitos de estas especies, favorecería una relación fuerza-frecuencia negativa, por el solo hecho de poseer poco tiempo disponible para la restitución mecánica (Frampton, 1991; Wier, 1986).

El modelo de IC a nivel celular presentado en esta tesis es simplificado y somos conscientes de que otras alteraciones también podrían estar influyendo en la escalera negativa del corazón insuficiente. Pero por una razón de simplicidad, sólo se han alterado y analizado las tres principales alteraciones que se asocian con mayor consenso en la literatura y se asocian con la generación de una relación fuerza-frecuencia negativa. Trabajos más recientes vinculan la pérdida de Ca^{2+} a través de los receptores de RyR ("Ca²⁺ leak"), con la depresión en la contractilidad del corazón insuficiente. Esta pérdida de Ca^{2+} por el RyR2 sería debido a una hiperfosforilación del mismo (Marx, 2000). Algunos autores atribuyen esta hiperfosforilación a PKA (Marx, 2000) en tanto

que en un modelo de IC en conejo se ha demostrado que la principal quinasa que fosforila a dichos receptores es la dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII) (Ai, 2005). Hasta el momento esta alteración en el manejo de Ca^{2+} no ha sido relacionada causalmente con el desarrollo de la escalera negativa, pero esto no debería dejarse sin consideración. Aunque en el desarrollo de esta tesis no se evaluó directamente la contribución del “ Ca^{2+} leak” al desarrollo de la escalera negativa, los experimentos (figura 22) en los que se redujo la expresión y actividad de la SERCA2a con TG y CPA, producen una disminución en la carga del RS, efecto similar al que produce la pérdida de Ca^{2+} por el RS a través de los RyR2, con lo que posiblemente llegaríamos a las mismas conclusiones. Esto es, que el “ Ca^{2+} leak” por sí mismo no sea capaz de generar una relación fuerza-frecuencia negativa, pero podría actuar sinérgicamente con otras alteraciones en el manejo del Ca^{2+} intracelular y contribuir así a convertir la escalera positiva en negativa.

En resumen, en esta primera parte del trabajo de tesis se modelaron, a nivel celular, las alteraciones básicas en el manejo del Ca^{2+} con el objetivo de mimetizar los cambios que ocurren en la IC y establecer su contribución relativa en la relación fuerza-frecuencia (acortamiento-frecuencia) negativa. Encontramos que la simple alteración de sólo una de ellas no es suficiente para inducir la escalera negativa y que la homeostasis del Ca^{2+} debe ser alterada en varios niveles para explicar la escalera negativa de la IC. Si estos resultados pudieran ser extrapolados al hombre, enfatizarían el concepto de que no hay un único mecanismo responsable del fenotipo contráctil de la escalera negativa observada en el corazón humano insuficiente sino que se requieren al menos dos de las tres alteraciones básicas del AEC en la IC (reducción de la SERCA2a, elevación del Na^+ ; y sobreexpresión del NCX) actuando en concierto.

2. LA APOPTOSIS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA (IC)

Como ya se explicó, quisimos investigar si existe alguna relación entre las principales alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} que ocurren en la IC, y la apoptosis que también se da en el corazón insuficiente y que constituye una causa importante de disfunción contráctil en esta patología. Estudiamos el aumento del Na^+ como posible desencadenante de apoptosis ya que ha sido descrito que ni el aumento del NCX ni la disminución de la SERCA2a, están asociados a apoptosis (ver más arriba). Como herramienta para aumentar el Na^+ intracelular usamos dosis no tóxicas de ouabaína, intervención también usada para aumentar dicho ión en la primera parte de este trabajo.

Existen trabajos donde se demuestra que la administración de dosis arritmogénicas, es decir, tóxicas de ouabaína disminuyen la viabilidad celular y promueven la apoptosis (Peng, 1996; Ramirez-Ortega, 2008). Además, recientemente los glucósidos cardiotónicos han sido utilizados en otros tejidos en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer debido a su efecto antiproliferativo, al promover la muerte celular. La exposición de células malignas provenientes de tejido de pulmón (Kometiani, 2005), de próstata (McConkey, 2000), incluso células de neuroblastoma (Hennion, 2002; Kulikov, 2007) y de leucemia (Guatabe, 1996) a glucósidos cardiotónicos induce la sobrecarga de Ca^{2+} , la muerte celular y la apoptosis de las mismas. Estos antecedentes sugieren que el aumento de Na^+ promovido por la administración de glucósidos cardiotónicos podría ser el que gatille la apoptosis. Sin embargo en estos estudios se utilizaron dosis tóxicas de glucósidos cardiotónicos y en ninguno de ellos se han explorado las posibles rutas de señalización que desencadenan la apoptosis.

En esta parte del trabajo de tesis nos propusimos investigar si dosis no tóxicas de glucósidos cardiotónicos, que producen una elevación del Na^+ intracelular similar a la que se presenta en la IC, causan apoptosis en el corazón y en ese caso, dilucidar los mecanismos por los cuales se desencadena la apoptosis.

2.1. Aumento en la concentración de Na⁺ intracelular como mecanismo de apoptosis

Los resultados presentados demuestran que los glucósidos cardiotónicos en dosis no tóxicas disminuyen la viabilidad celular al menos en parte porque promueven la apoptosis. Esta disminución en la viabilidad celular ocurre asociada a un aumento del Na⁺ y Ca²⁺ intracelular y es revertida por un bloqueante del modo reverso del NCX y por inhibición de la CaMKII. El hecho de que se haya podido prevenir la muerte celular y la apoptosis con KBR sugerirían que es el aumento de Na⁺ intracelular el responsable de iniciar la cascada apoptótica de los glucósidos cardiotónicos. Además, el hecho de que la disminución de la viabilidad mediada por ouabaína ocurra en especies que como la rata y el gato tienen diferente sensibilidad a los glucósidos cardiotónicos, permitiría extrapolar estos resultados a la especie humana, abriendo nuevas perspectivas para futuros estudios en el área de la IC.

Los resultados obtenidos demuestran que la disminución en la viabilidad es debida al menos en parte a apoptosis ya que observamos un aumento de la actividad de caspasa-3 (figura 39), que como habíamos mencionado, es una efectora final de las rutas de señalización que llevan a la apoptosis. Encontramos además, y como muestra la figura 40, un aumento del cociente Bax/Bcl-2 también indicativo de apoptosis. Este aumento del cociente Bax/Bcl-2, podría sugerir una participación de la mitocondria, en la cascada apoptótica inducida por ouabaína, ya que la regulación de los poros de transición mitocondrial (mPTP) está íntimamente relacionada con el balance entre estas proteínas pro y antiapoptóticas (Orrenius, 2003) (para rev. ver Seon-Yong, 2008).

2.2 Mecanismos que conducen a la muerte celular inducida por la elevación del Na⁺,

2.2.1 Rol del NCX

En trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros grupos, se demuestra la participación del modo reverso del NCX en la sobrecarga de Ca²⁺ y la apoptosis que ocurren en diferentes situaciones tales como la estimulación alpha-1 adrenérgica o la isquemia y reperfusión (Miyamoto, 2005; Vila Petroff, 2007). Los presentes resultados coinciden con estos hallazgos ya que cuando

utilizamos el inhibidor específico del modo reverso del NCX, KBR, prevenimos la muerte celular y la apoptosis inducida por la elevación del Na^+ , inducida por ouabaína (figura 40). Especulamos que la inhibición de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, produce un incremento de Na^+ que fuerza al NCX a trabajar en modo reverso y a producir una entrada de Ca^{2+} capaz de desencadenar una señal apoptótica. Es interesante que el grupo de Satoh y colaboradores (Satoh, 2003), describe que los efectos tóxicos de la administración aguda de ouabaína (por efectos tóxicos los autores se refieren a las arritmias) se dan a través del funcionamiento del modo reverso del NCX y pueden ser bloqueados por KBR, en tanto que los efectos no tóxicos se dan a través del modo directo del intercambiador. En el caso de esta tesis se trabajó con dosis no tóxicas de ouabaína aunque sostenidas. Si bien estas no son arritmogénicas, están mediadas por el modo reverso del NCX y producen otros tipos de efectos deletéreos ya que culminan en apoptosis.

2.2.2 Rol de la CaMKII

Existen numerosos trabajos donde se señala a la CaMKII como un intermediario común de varios estímulos de muerte celular por apoptosis (Wright, 1997; Yang, 2006; Vila Petroff, 2007; Zhu, 2007). Además existen trabajos en diferentes modelos de IC donde se describen incrementos en la expresión de la CaMKII (Hoch, 1999; Kirchhenfer, 1999; Zhang, 2004). Recientemente un trabajo de Lee y colaboradores vincula a la CaMKII con la transición de la hipertrofia a la IC (Lee, 2009). En un trabajo previo de nuestro laboratorio donde demostramos la participación del modo reverso del NCX en la apoptosis inducida por I/R, también se demostró que el influjo de Ca^{2+} a través del NCX activaba a la CaMKII y desencadenaba la apoptosis (Vila Petroff, 2007). Con estos antecedentes, evaluamos en el presente trabajo la posible participación de la CaMKII en la apoptosis observada con dosis no tóxicas de ouabaína y encontramos que: 1) el uso del inhibidor farmacológico de la CaMKII, KN-93, como muestra la figura 41, previno la disminución en la viabilidad celular y disminuyó los índices apoptóticos (cociente Bcl-2/Bax y activación de caspasa-3) causados por la elevación del Na^+ intracelular. 2) La utilización de un inhibidor más específico de la CaMKII, AIP, también previno la muerte celular inducida por la elevación del Na^+ . 3) la sobreexpresión de la

CaMKII mediante tecnología de transferencia génica, exacerbó la muerte celular inducida por la elevación del Na^+ intracelular (figura 44). Pensamos que la combinación de técnicas de manipulación genética junto con estrategias farmacológicas, provee una evidencia importante que permite sustentar la hipótesis de que la CaMKII está involucrada en la muerte celular inducida por la elevación del Na^+ intracelular.

Experimentos previos indican que el efecto de los glucósidos cardiotónicos podrían activar cascadas de señalización que son independientes de los cambios del gradiente de Na^+ y K^+ . De este modo, la bomba Na^+/K^+ ATPasa podría interactuar estar mediado con proteínas solubles de la membrana citoplasmática, tales como el receptor del factor de crecimiento epidermal, caveolinas, la proteína quinasa C (PKC), la fosfolipasa C (PLC) y luego activar las diferentes rutas de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKS). Esto afectaría la expresión de diferentes genes entre ellos los involucrados en la muerte, el crecimiento y la proliferación celular (Liu, 2003; Xie, 2003). Estos hallazgos podrían sugerir que la muerte celular observada en los experimentos de esta tesis podría deberse a este mecanismo de acción y no al aumento en el Na^+ intracelular propuesto en este trabajo. Sin embargo y como ya se discutió más arriba, el hecho que al inhibir el NCX a través del uso del KBR se prevenga la muerte celular y la apoptosis, sugeriría que la cascada de muerte celular se da a través de la elevación del Na^+_i . Estos resultados, aunque no descartan que el efecto observado de los cardiotónicos sea en parte producido por una interacción de la bomba Na^+/K^+ ATPasa con las proteínas citoplasmáticas y la consecuente activación de rutas de señalización, que favorecen la apoptosis, indicarían que en la muerte celular observada en los miocitos con dosis bajas de ouabaína, está implicado el aumento del Na^+_i . Quizás más importante, los presentes resultados señalan a la CaMKII como la molécula mediadora de este fenómeno de apoptosis y sugerirían que el aumento de la $[\text{Na}^+]_i$ de la IC podría ser el disparador de la apoptosis mediada por CaMKII en esa entidad patológica.

En resumen los resultados presentados relacionados al segundo objetivo mostraron que la elevación de la $[\text{Na}^+]_i$ a través de la inhibición de la bomba

Na⁺/K⁺ATPasa usando dosis no tóxicas de glucósidos cardiotónicos promueve la apoptosis de los cardiomiocitos y este efecto se encuentra conservado entre especies con distinta sensibilidad a los cardiotónicos. Nuestros resultados indican además que la muerte celular por apoptosis sería desencadenada por la elevación de la [Na⁺] intracelular que, a través del NCX, promovería el aumento del Ca²⁺ intracelular. Este aumento que activaría a la CaMKII y desencadenaría la apoptosis. Este mecanismo podría ser uno de los responsables de la apoptosis elevada en la IC. Estos resultados indican que el aumento de Na⁺; tendría un rol fundamental en la disfunción contráctil del corazón insuficiente dado que por un lado promueve la apoptosis y por otro colabora con las otras alteraciones del manejo del Ca²⁺ para inducir la escalera negativa, una de las consecuencias mas adversas del manejo del Ca²⁺ alterado que se presenta en la IC.

CONCLUSIONES FINALES

El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar el papel que tienen las alteraciones en el manejo del Ca^{2+} intracelular en el desarrollo de la escalera negativa y en la pérdida de unidades contráctiles por apoptosis ya que ambos fenómenos son actualmente considerados como componentes claves de la disfunción contráctil del corazón insuficiente. Conocer en profundidad los mecanismos subcelulares responsables de estos fenómenos permitirá reconocer nuevos blancos moleculares permitiendo el diseño de novedosas terapias para el tratamiento de la IC confeccionadas y dirigidas específicamente a las bases moleculares que subyacen a esta entidad patológica.

En este estudio examinamos el rol de la SERCA2a disminuida, el NCX aumentado y el Na^+_i elevado en la transformación de la escalera positiva en negativa. Encontramos que la simple alteración de sólo uno de estos componentes no es suficiente para inducir la escalera negativa y que en cambio se requieren al menos dos de estas alteraciones básicas del AEC actuando conjuntamente para inducir la escalera negativa, situación que es exacerbada cuando las tres alteraciones se producen simultáneamente. La estrategia de reproducir o mimetizar en una célula sana las tres alteraciones básicas del AEC permitió además, recapitular el fenotipo contráctil del corazón insuficiente creando así, un modelo celular de IC que potencialmente podría ser muy útil para estudiar, en un sistema simplificado, otros interrogantes relacionados con la disfunción contráctil del corazón insuficiente.

Por último, en este estudio también se obtuvieron evidencias de que la elevación del Na^+ intracelular puede promover la apoptosis. Este proceso estaría mediado por el ingreso de Ca^{2+} a través del modo reverso del NCX y la subsiguiente activación de la CaMKII que mediante la fosforilación de distintos sustratos, aun no identificados, desencadenaría la apoptosis. Estos hallazgos permiten especular que en la IC, donde el Na^+_i así como la expresión del NXC y la CaMKII se encuentran aumentados, un mecanismo similar al descrito podría tener un rol causal en la elevada incidencia de este tipo de muerte celular que se observa en esta entidad patológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adachi-Akahane S, Lu L, Li Z, Frank JS, Philipson KD, Morad M. Calcium signaling in transgenic mice overexpressing cardiac Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *J Gen Physiol.* 1997. 109:717-29.
2. 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. 2005. *Circ Res.* 97:1314-22.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the cell.* 2002. 4th ed.
4. Allen DG and Kentish JC. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1985. 17:821-840.
5. Alvarez BV, Perez NG, Ennis IL, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. Mechanisms underlying the increase in force and calcium transient that follows stretch of cardiac muscle: A possible explanation of the Anrep effect. 1999. *Circ Res.* 85: 716-722.
6. Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res.* 1994. 74: 555-64.
7. Aránguiz P, Contreras A, Rojas D, Troncoso R, Marambio P, Lavandero S. Autofagia del cardiomiocito: ¿un nuevo mecanismo de adaptación al estrés o de muerte celular? *Rev Chil Cardiol.* 2008. 25(3): 331-338.
8. Asahi M, MacKenna E., Kurzydowski K., Tada M. y MacLennan D.H. (2000). Physical interactions between phospholamban and sarco(endo)plasmatic reticulum Ca²⁺-ATPases are dissociated by elevated Ca²⁺, but not by phospholamban phosphorylation, vanadate or thapsigargin and are enhanced by ATP". *J Biol Chem.* 2000. 275(20):15034-8.
9. Baartscheer A, Schumacher CA, Van Borren MM, Belterman CN, Coronel R, Fiolet JW. Increased Na⁺/H⁺-exchange activity is the cause of increased [Na⁺]_i and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model. *Cardiovasc Res.* 2003. 57: 1015-1024.
10. Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser MM, Lehmann LH, Patrick DM, Grueter CG, Qi X, Richardson JA, Hill JA, Katus Ha, Bassel-Duby, Maier

- LS, Olson E. The δ isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. PNAS. 2008.106(7): 2342-2347.
11. Bassani JW, Bassani RA y Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species dependent differences en cellular mechanisms". J Physiol. 1994. 476(2):279-93.
 12. Bers DM, Bassani JW, Bassani RA. Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. Ann N Y Acad Sci. 1996.779:430-42.
 13. Bers DM, Despa S. Cardiac Myocytes Ca^{2+} and Na^{+} Regulation in Normal and Failing Hearts. 2006. J Pharmacol Sci. 100: 315-322.
 14. Bers DM, Stiffel VM. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. Am J Physiol. 1993. 264(6 pt 1): C1587-93.
 15. Bers DM. Altered Cardiac Myocyte Ca Regulation In Heart Failure. Physiology. 2006. 21:380-387.
 16. Bers DM. Calcium Fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. Circ Res. 2000. 87:275-81.
 17. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002.415.
 18. Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force (2nd ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 2001.
 19. Bakaly G, Sperelakis N, Doane J. A new method for preparation of isolated single adult myocytes. Am J Physiol. 1984. 247: H1018-H1026.
 20. Block BA, Imagawa T, Campbell KP y Franzini-Armstrong C. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. J Cell Biol. 1998. 107(6 pt2):2587-600.
 21. Boda LL, Mikala G, Cerril E, Koch, Shahab A, Akhter, and Schwarts A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. The Journal of Clinical Investigation. 2005. 115, 15.
 22. Boerth SR, Zimmer DB, Artman M. Steady-state mRNA levels of the sarcolemmal Na^{+}/Ca^{2+} exchanger peak near birth in developing rabbit and rat hearts. Circulation Research. 1994. 74(2):354-9.

23. Bowditch HP. Über die eigenthümlichkeiten der rezbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Bersshs Ges Wiss.* 1871. 23:652-689.
24. 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.
25. Braunwald E, Bristow MR. Congestive Heart Failure: Fifty Years of Progress. *Circulation.* 2000. 102: IV-14.
26. Carafoli E, Stauffer T. The plasma membrane calcium pump: a functional domains, regulation of the activity and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol.* 1994. 25(3):312-24.
27. Chadwick CC, Saito A, Fleischer S. Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990. 87(6):2132-3136.
28. Chattou S, Coulombe A, Diacono J, Le Grand B, John G, Feuvray D. Slowly inactivating component of sodium current in ventricular myocytes is decreased by diabetes and partially by known $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange blockers. *J Mol Cell Cardiol.* 2000. 32:1181-1192.
29. Cheng H, Lederer MR, Xiao RP, Gómez AM, Zhou YY, Ziman B, Spurgeon H, Lakatta EG, Lederer WJ. Excitation-contraction coupling in heart: new insights from Ca^{2+} sparks. *Cell Calcium.* 1996. 20(2): 129-140.
30. Cingolani HE, Housay AB. Músculo esquelético, cardíaco y liso. En *Fisiología Humana de Housay. Sección 4.* (ed) El Ateneo 2000, pp 59-93.
31. Crow MT, Mani K, Nam Y-J, Kitsis RN. The mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis. *Circ Res.* 2004. 95:957-970.
32. Davia K, Davies CH, Harding SE. Effects of inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium uptake on contraction in myocytes isolated from failing human ventricle. *Cardiovasc Res.* 1997. 33:88-97.
33. Dedkova EN, Blatter LA. Mitochondrial Ca^{+2} and the heart. *Cell calcium.* 2007. 44:77-91.
34. del Monte F, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, et al. Restoration of contractile functions in isolated cardiomyocytes from

- failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation*. 1999. 100:2308-11.
35. Despa S, Islam MA, Pogwizd SM, Bers DM. Intracellular Na⁺ concentration is elevated in heart failure, but Na⁺, K⁺-pump function is unchanged. *Circulation*. 2002. 105:2543-2548.
 36. Deveraux QL, Roy N, Stnnicke HR, Van Ardsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM: IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*. 1998. 17:2215-23.
 37. Dipolo R, Reauge L. Sodium / Calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions". *Physiol Rev*. 2006 86(1): 155-203.
 38. Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Ann Rev. Biochem*. 1991.60:653-88.
 39. el-Saleh SC, Warber KD, Potter JD. The role of tropomyosin-troponin in the regulation of skeletal muscle contraction. *J Muscle Res Cell Motil*. 1986. 7(5):387-404.
 40. Endoh M. Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *European Journal of Pharmacology*. 2004. 500: 73-86.
 41. Endoh M. Signal Transduction and Ca²⁺ signaling in Intact Myocardium. *J Pharmacol Sci*. 2006. 100:525-537
 42. Endoh M, Blinks JR. Actions of sympathomimetic amines on the Ca²⁺ transients and contraction of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to Ca²⁺ mediated through α and β -adrenoceptors. *Circ Res*. 1988. 62:247-265.
 43. Fabiato A and Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac skeletal muscle. *J. Physiol*. 1978. 276: 233-255.
 44. Fabiato A, Fabiato F. Contractions induces by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a single skinned cardiac cell". *J Physiol*. 1975. 249(3):469-95.
 45. Fairman E. Epidemiología de la insuficiencia cardíaca: ¿Cuáles son los aspectos que debemos conocer?. *Revista del Conarec*. 2001. 62: 116-130.

46. Feldman MD, Gwathmey JK, Phillips P, Schoen F, Morgan JP. Reversal of the force-frequency relationship in working myocardium from patients with end-stage heart failure. *J Appl Cardiol.* 1988. 3: 273-283.
47. Fernando de la Serna. Insuficiencia Cardíaca Crónica. *Fisiopatología General*, pp 14 capítulo 2.
48. Ferrero P, Said M, Sánchez G, Vittone L, Valverde C, Donoso P, Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C. Ca^{2+} /calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca^{2+} -induced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2007. 43(3): 281-291.
49. Ferris CD, Haganir RL, Supattapone S, Snyder SH. Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature.* 1989. 342(6245): 87-9.
50. Flesch M, Schwinger RH, Frank K, Sudkamp M, Kuhn-Regnier F, et al. Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in failing human myocardium. *Circulation.* 1996. 94:992:1002.
51. Frampton JE, Harrison SM, Boyett MR, Orchard CH. Ca^{2+} and Na^{+} in rat myocytes showing different force-frequency relationships. *Am J Physiol.* 1991. 261:C739-50.
52. Frank JS, Langer GA. The myocardial interstitium: Its structure and its role in ionic exchange. *J Cell Biol.* 1974. 60:586-601.
53. Gill C, Mestral R, Smali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease-anovel therapeutic target?. *FASEB J.* 2002. 16:135:146.
54. Glitsch HG. Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. *Physiol Rev.* 2001. 81:1791-1826.
55. Gomez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, McCune SA, Altschuld RA, Lederer WJ. *Science.* 1997. 276(5313): 800-6.
56. Gomez DE, Alonso DF. Propiedades de la célula transformada en *Introducción a la Oncología Molecular*. Ed. de la Universidad Nacional de Quilmes. pp: 95-111.

57. Granzier HI, Irving TC. Passive tenion in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J*. 1995. 68: 1027-1044.
58. Granzier HI, Labeit S. Structure-function raltions of the giant elastic protein titin in striated and smooth muscle cells. *Muscle Nerve*. 2007. 36: 740-755.
59. Gray RP, McIntyre H, Sheridan DS, Fry CH. 2001. Intracellular sodium and contractile function in hypertrophied human and guinea-pig miocardium. *Pflugers arch*. 2001. 442:117-23.
60. Guatawe BM, Masuda Y, Nakajo S, Yoshida T, Kuroiwa Y, Nakaya K. The cooperative interaction of two different siganling pathway in response to bufaling induces apoptosis in human leukemia U937 cells. *J Biol Chem*. 1996. 271: 14067-72.
61. Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Kajstura J, Anversa P. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res*. 1999. 85:856-866.
62. Hasenfuss G, Holubarsch C, Hermann HP, Astheimer K, Pleske B, Just H. Influence of force-frequency relationship on haemodynamics and left ventricular function in patients with non-faling and patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 1994. 15:164-170.
63. Hasenfuss G, Pieske B. Calcium Cycling in Congestive Heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2002. 34:951-969.
64. Hasenfuss G, Reinecke H, studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase en failing and nonfailing human myocardium. *Circ res*. 1994. 75:434-442.
65. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H. Relationship between Na^{+} - Ca^{2+} -exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*. 1999. 99:641-648.
66. Hasenfuss G. Alterations of calcium regulatory proteins in heart failure. *Cardiovascular Research*. 1998. 37: 279-289.

67. He TC, Zhou S, Costa LT, Yu J, Kinzler K, Vogelstein B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1998. 95:2509-2514.
68. Hennion JP, el-Masri MA, Huff MO, el-Mailkah RS. Evaluation of neuroprotection by lithium and valproic acid against ouabain induced cell damage. *Bipolar Disord.* 2002. 4:201-6.
69. Hobai IA, Maack C, Brian O'Rourke. Partial inhibition of sodium/calcium exchange restores cellular calcium handling in canine heart failure. *Circ Res.* 2004. 95:292-299.
70. Hobai IA, O'Rourke B. Enhanced Ca^{2+} -activated Na^+ - Ca^{2+} exchange activity in canine pacing induced heart failure. *Circ Res.* 2000. 87:690-698.
71. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase in failing and nonfailing human human myocardium. *Circ Res.* 1999. 84: 713-21.
72. Homma N, Amran S, Nagasawa Y, Hashimoto K. Topics on the Na^+ / Ca^{2+} Exchange System in Cardiac Triggered Activity. *Journal of Pharmacological Sciences* . 2006. 102:17-21.
73. James TN. The variable morphological coexistence of apoptosis and necrosis in human myocardial infarction; significance for understanding in pathogenesis, clinical course, diagnosis and prognosis. *Coronary Artery Dis.* 1998. 9: 291-307.
74. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports.* 2008. 41(1):11-22.
75. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte deaths are independent contributing variables of infarct size rats. *Lab Invest.* 1996. 74:86-107.
76. Kang PM, Izumo S. Apoptosis and heart failure. A critical review of literature. *Circ Res.* 2000. 86:1107-1113.
77. Katz AM. Excitation-contraction coupling. In *Physiology of the heart.* (ed) AM Katz Raven Press. New York. 1977. pp 137-149

78. Kim CH, Fan TH, Kelly PF et al. Isoform-specific regulation of myocardial Na⁺, K-ATPase alpha subunit in congestive heart failure. Role of norepinephrine. *Circulation*. 1994. 89:313-320.
79. Kometiani P, Liu L, Askari A. Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells. *Mol Pharmacol*. 2005. 67: 929-36.
80. Kothakota S. Caspase 3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 1997. 278, 294-298.
81. Kulikov A, Eva A, Kirch U, Boldyrev A, Scheiner-Bobis G. Ouabain activates signaling pathway associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochem Biophys Acta*. 2007.1768:1691-702.
82. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227 (5259):680-5.
83. Lee JA and Allen DG. Altering the strength of the heart: basic mechanisms. In *Modulation of Cardiac Calcium Sensivity. A New Approach to Increasing the Strength oh the Heart*. (ed) Oxford University Press. 1993. pp 1-36.
84. Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis*. 2009. 14:536-548.
85. Linck B, Qiu Z, He Z, Tong Q, Hilgemann DW, Philipson KD. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemal Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3). *Am J Physiol*. 1998. 274: C415-23.
86. Ling H, Zhang T, Pereira L, Means KM, Cheng H, Gu YG, 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.
87. Liu L, Mohammadi BA, Aynafshar B, Wang H, Li D, Liu J, Ivanov AV, Xie Z, Askari A. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na⁺/K⁺-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003. 284:1550-1560.
88. Luo J, Deng Z-H, Luo X, Tang N, Song W-X, Cheng J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW, Vogelstein B, He T-C. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nature Protoclols*. 2007. 2:1236.

89. Maier LS, Wahl-Schott C, Horn W, Weichert S, Pagel C, Wagner S, Dybkova N, Müller OJ, Näbauer 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.
90. Mair LS, Bers DM. Role of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007. 73:631-40.
91. Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI. Chronic Heart Failure Slows Late Sodium Current in Human and Canine Ventricular Myocytes: Implications for Repolarization Variability. *Eur J Heart Fail.* 2007. 9(3): 219-227.
92. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing heart. *Cell.* 2000. 101: 365-76.
93. Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI3-Kinase and AKT. *J Mol Cell Cardiol.* 2005. 38:63-71.
94. Matsuoka S, Nicoll DA, Reilly RF, Hilgemann DW, Philipson KD. Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993. 90(9):3870-3874.
95. Mattiazzi A, Hove-Hadsen L, Bers DM: Protein kinase inhibitors reduce SR Ca transport in permeabilized cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 1994. 267(2 pt 2):H812-820.
96. Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, et al. Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest.* 1990. 85: 305-9.
97. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Posival H, et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1995. 92(4): 778-84.
98. Mills GD, Harris DM, Cheng X; Houser SR. Intracellular sodium determines frequency-dependent alterations in contractility in

- hypertrophied feline ventricular myocytes. *AM J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006. 292: H1129-38.
99. Miura Y, Kimura J. Sodium-calcium exchange current. *J Gen Physiol*. 1989. 93:1129-45.
100. Miyamoto S, Howes AL, Adams JW, Dorn GW 2nd, Brown JH. Ca²⁺ dysregulation induces mitochondrial depolarization and apoptosis: role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger and AKT. 2005. 280:38505-12.
101. Morano I, Bachle-Stolz C, Katus A and Rüegg JC. Increased calcium sensitivity of chemically skinned human atria by myosin light chain kinase. *Basic Res. Cardiol*. 1988. 83:350-359.
102. Mubagwa K, Lin W, Sipido K, Bosteels S, Flameng W. Monesin-induced reversal of positive force-frequency relationship in cardiac muscle: role of intracellular sodium in rest-dependent potentiation of contraction. *J Mol Cell Cardiol*. 1997. 29:977-89.
103. Mulieri LA, Hansefuss G, Leavitt B, Allen PD, Alpert NR: Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation*. 1992. 85: 1743-50.
104. Muller OJ, Lange M, Rattunde H, Lorenzen HP, Muller M, Frey N, et al. Transgenic rat hearts overexpressing SERCA2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload. *Cardiovasc Res*. 2003. 59:380-9.
105. Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Cingolani HE, Orchard CH. Effects of acidosis on phosphorylation of phospholamban and troponin I in rat cardiac muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1996. 270:C107-C114.
106. Nakai J, Imagawa T, Hakamata Y, Shigekawa M, Takeshima H y Numa S. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett*. 1990 271(1-2): 169—77.
107. Nuss HB, Houser SR. Sodium-calcium exchange-mediated contractions in feline ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1992. 263 (4 pt 2): H1161-9.
108. O'Rourke B, Kass DA, Tomasselli GF, Kaab S, Tunin R, Marban E. Mechanisms of Altered Excitation-Contraction Coupling in Canine

- Tachycardia-Induces Heart Failure, Experimental Studies. *Cir Res.* 1999. 84(5): 562-70.
109. Ogawa Y, Kurebayashi N, Murayama T. Putative roles of type 3 ryanodine receptor isoforms. *Trends Cardiovasc Med.* 2000. 10:65-70.
 110. Orrenius S, Zhivotovky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003. 4:552-65.
 111. Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.* 1996. 10:587-597.
 112. Peng M, Huang L, Xie Z, Hang WH, Askari A. Partial inhibition of Na⁺/K⁺ATPase by ouabain induces the Ca²⁺ dependent expressions of early-response genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1996. 271:10372-8.
 113. Piacentino V 3rd, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, et al. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. 2003. 92 (6):651-8.
 114. Piacentino V 3rd, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, Houser SR. Cellular basis of abnormal calcium transient of failing human ventricular myocytes. *Cir Res.* 92: 651-658.
 115. Pieske B, Houser SR. [Na⁺]_i handling in the failing human heart. *Cardiovasc Res.* 2003. 57: 874-886.
 116. Pieske B, Maier LS, Piacentino V 3rd, Weisser J, Hasenfuss G, Houser S. Rate dependence of Na⁺_i and contractility in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation.* 2002. 106:447-53.
 117. Pogwizd SM, Yuan W, Samarel AM, Bers DM: Upregulation of Na/Ca exchange in a arrhythmogenic model on nonischemic cardiomyopathy in the rabbit. *Circ Res.* 1999. 85:1009-1019.
 118. Pogwizd SM; Sipido KR, Verdonck F, Bers DM. Intracellular Na⁺ in animals models of hypertrophy and heart failure: contractile function and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res.* 2003. 57: 887-896.
 119. Prunier F, Chen Y, Gellen B, Heimbürger M, Choqueux C, Escoubet B, Micehl JB, Mercadier JJ. Left Ventricular SERCA2a gene down-regulation does not parallel ANP gene up-regulation during post-MI remodelling in rats. *The European Journal of Heart Failure.* 2005. 7: 739-747.

120. Puglisi JL, Bassani RA, Bassani JW, Amin JN, Bers DM. Temperature and relative contributions of Ca transport system in cardiac myocyte relaxation. *Am J Physiol.* 1996. 270:H1772-8.
121. Ramirez-Ortega M, Zarco G, Maldonado V, Carrillo JF, Ramos P, Ceballos G, Melendez-Zajgla J, Garcia N, Zazueta C, Chanona J, Suarez J, Pastelin G. Is digitalis compound-induced cardiotoxicity, mediated through guinea-pig cardiomyocytes apoptosis?. *Eur J Pharmacol.* 2007. 566:34-42.
122. Regula KM, Kirshenbaum LA. Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2005. 38: 3-13.
123. Rossman AI, Petre RE, Chaudhary KW, Piacentino V 3rd, Janssen PM, Gaughan Jp. Abnormal frequency-dependent responses represent the pathophysiologic signature of contractile failure in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2004. 36: 33-42.
124. Ruegg JC. Cardiac contractility: how calcium activates the myofilaments. *Naturwissenschaften.* 1998. 85(12):575-82.
125. Satoh H, Ginsburg KS, Qing K, Terada H Hayashi H, Bers DM. KB-R7943 block of Ca(2+) influx via Na(+)/Ca(2+) exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents Ca(2+) overload in rat ventricular myocytes. *Circulation.* 2002. 101:1441-6.
126. Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, Drogaris K, Darmer D. Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: fragile balance of myocyte survival?. *J Am Coll Cardiol.* 2002. 39:481-8.
127. Schillinger W, Janssen PM, Emami S, Henderson SA, Ross RS, Teucher N, et al. Impaired contractile performance of cultured rabbit ventricular myocytes after adenoviral gene transfer of Na(+)/Ca(2+) exchanger. *Circ Res.* 2000. 87:581-7.
128. Schillinger W, Lehnart SE, Prestle J, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Just H, Hasenfuss G. Influence of SR Ca²⁺ATPase and Na⁺-Ca²⁺ exchanger on the force-frequency relation. *Basic Res Cardiol.* 1998. 93:38-45.

129. Schwinger RH, Bhöm M, Schmidt U, Karczewski P, Bavendiek U, Flesch M, Krause E-G, Erdmann E. Unchanged Protein Levels of SERCA II and Phospholamban but Reduced Ca^{2+} Uptake and Ca^{2+} -ATPase Activity of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum From Dilated Cardiomyopathy Patients Compared With Patients With Nonfailing Hearts. *Circulation*. 1995. 92:3220-3228.
130. Schwinger RH, Wang J, Frank K et al. Reduced sodium pump $\alpha 1$, $\alpha 3$, and $\beta 1$ isiform protein levels and Na^+ , K^+ -ATPase activity but unchanged Na^+ - Ca^{2+} exchanger protein levels in human heart. *Circulation*. 1999. 99: 2105-2112.
131. Sedova M, Dedkova EN, Blatter LA. Integration of rapid cytosolic Ca^{2+} signals by mitochondria in cat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2006. 291:C840-C850.
132. Seon-Yong Jeong y Dai-Wu Seol. The role mitochondria in apoptosis. *BMB reports*. 2008.
133. Seth M, Sumbilla C, Mullen SP, Lewis D, Klein MG, Hussain A, et al. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) gene silencing and remodeling of the Ca^{2+} signaling mechanism in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. 101:16683-8.
134. Seth P. *Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy*, capítulo 15. Edited By Prem Seth Human Gene Therapy Research Institute. 1999. ISBN: 978-1-57059-584-4
135. Shamraj OI, Gruop IL, Grupp G et al. Characterisation of Na/K-ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing human hearts. *Cardiovasc Res*. 1993. 27:2229-2237.
136. Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM. Elevated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in intact ventricular myocyte from rabbits in heart failure. *Circ Res*. 2003. 93: 592-4.
137. Shattock MJ, Bers DM. Rat vs. rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol*. 1989. 256:C813-22.
138. Simmerman HK, Kobayashi YM, Autry JM, Jones LR. A leucine zipper stabilizes the pentameric membrane domain of phospholamban

- and forms a coiled-coil pore structure. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996. 271:5941-5946.
139. Sipido KR, Volders PG, de Groot SH, Verdonck F, Van de Werf F, Wellens HJ, Vos MA. Enhanced Ca^{2+} release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation*. 2000. 102:2137-2144.
 140. Solaro RJ and Rarick HM. Troponin and tropomyosin-proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ. Res*. 1998. 43: 471-480.
 141. Sollot SJ, Ziman BD, Lakatta EG. Novel technique to load indo-1 free acid into single adult cardiac myocytes to assess cytosolic Ca^{2+} . *Am J Physiol*. 1992. 262: H1941-9.
 142. Spurgeon HA, Stern MD, Baartz G, Raffaelli S, Hansford RG, Talo A, Lakatta EG, Capogrossi MC. Simultaneous measurements of Ca^{2+} , contraction and potential in cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1990. 258: H574-H586.
 143. Szabadkai G, Rizzuto R. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood. *FEBS Lett*. 2004. 567:111-5.
 144. Undrovinas AI, Maltsev VA, Sabbah HN. Repolarization abnormalities in cardiomyocytes of dogs with chronic heart failure: role of sustained inward current. *Cell Mol Life Sci*. 1999. 55:594-505.
 145. Vafiadaki E, Arvanitis DA, Pagakis SN, Papalouka V, Sanoudou D, Kontrogianni-Konstantopoulos A, Kranias EG. The anti-apoptotic protein HAX-1 interacts with SERCA2 and regulates its protein levels to promote cell survival *Mol Biol Cell*. 2009. 20:306-18.
 146. van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovascular Research*. 2005. 67:21-29.
 147. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000. 102: 43-53.

148. Vila Petroff M, Salas MA, Said M, Valverde CA, Sapia L, Portiansky E, Hajjar RJ, Kranias EG, Mundiña-Weilenmann, Mattiazzi A. CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 2007. 73:689-698.
149. Vila Petroff MG, Palomeque J, Mattiazzi A. Na⁺-Ca²⁺ Exchange function underlying contraction frequency inotropy in the cat myocardium. *J Physiol*. 2003. 550:801-817.
150. 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. 116:3127-38.
151. Walker JW, Somlyo AV, Goldman YE, Somlyo AP, Trentham DR. Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature*. 1987. 327(6119): 249-252.
152. Wang K, Forbes JG, Jin AJ. Single molecule measurement of titin elasticity. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 2001. 77: 1-44.
153. Weherens XHT, Marks AR. Novel therapeutic approaches for heart failure by normalizing calcium cycling. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004. 3: 565-574.
154. Weisser-Thomas J, Kubo H, Hefner CA, Gaughan JP, McGowan BS, Ross R, et al. The Na⁺/Ca²⁺ exchanger/SR Ca²⁺ ATPase transport capacity regulates the contractility of normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *J Card Fail*. 2005. 11:380-7.
155. Wier WG, Yue DT. Intracellular calcium transient underlying the short-term force interval relationship in ferret ventricular myocardium. *J Physiol*. 1986. 376:507-30.
156. Woodcock E, Matkovich SJ. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005. 1746-1751.
157. Woodcock EA, Matkovich SJ. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* . 2005. 37:1746-1751.

158. Woodworth RS. Maximal contraction, " staircase" contraction refractory period, and compensatory pause, of the heart. *Am J Physiol.* 1902. 8:213-249.
159. Wright SC, Schelleneberger U, Ji L, Wang H, Larrick J. Calmodulin-dependent protein inase II mediates signal transduction in apoptosis. *Faseb J.* 1997. 11:843-849.
160. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM. Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-contraction coupling. *J Clin Invest.* 2006.116:675-82.
161. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 1995. 5(1): 97-104.
162. Xie Z, Cai T. Na⁺-K⁺-ATPase-Mediated Signal Transduction: From Protein Interaction to cellular Function. *Molecular Interactions.* 2003. 3(3):157-168.
163. Yao A, Su Z, Nonaka A, Zubair I, Lu L, Philipson KD, et al. Effect of overexpression of the Na⁺-Ca²⁺ exchnager on [Ca²⁺]_i transient in murine ventricular myocyte. *Circ Res.* 1998. 82: 657-65.
164. Yue DT, Marban E and Wier EG. Relationship between force and intracellular [Ca²⁺] in tetanized mammalian heart muscle. 1986. *J Gen Physiol.* 87:223-242.
165. Zhang L, Zhang Z, Guo H, Wang Y. Na⁺/K⁺-ATPase-mediated signal transduction and Na⁺/K⁺-ATPase regulation. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008. 22(6):615-21.
166. Zhang T, Brown JH. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 2004. 63:476-486.
167. Zhu W, Woo AY, Yang D, Chen H, Crow MT, Xiao RP. Activation of CaMKII deltaC is common intermediate of diverse death stiuli-induced heart muscle cell apoptosis. *J Biol Chem.* 2007. 282:10833-9.
168. 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.
111:617-25.

169. Zimmerman ANE. Substraat-geïnduceerde contractilitesremming en de "calciumparadox" bij get geïsoleerde doorstroomderatte heart. 1965. Thesis, Amsterdam.

APÉNDICE

Apéndice 1

Desde que en 1953 un becario postdoctoral, Wallace Rowe, del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos aisló el primer adenovirus de células adenoides humanas en cultivo, más de 100 especies diferentes de adenovirus se lograron identificar hasta la actualidad. Existen aproximadamente 50 serotipos de adenovirus que se hospedan en células humanas que causan numerosas enfermedades respiratorias y digestivas entre otras algunas de importante gravedad. Es por esto que su estructura y genoma han sido estudiados en profundidad.

La habilidad que tienen los adenovirus para infectar un amplio rango de tipos celulares, así como la facilidad con la que se puede manipular su genoma los ha transformado en un atractivo vector para la terapia génica y la transferencia génica *in vitro*, en especial los serotipos 2 y 5 (Serotipo: es un tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presenta en su superficie celular) son los más utilizados en la transferencia génica aplicada a la biomedicina (para rev. ver Davis et al, 2009)

Biología básica de los adenovirus.

De la biología básica de los adenovirus, lo importante de describir sobre todo en el marco del propósito de esta tesis, es la estructura básica de su genoma, ya que éste va a ser el que se va a manipular para poder transportar el gen de interés a los miocitos cardíacos. Los adenovirus carecen de envoltura externa, pero están rodeados por una capa o cápside de proteínas que forman un icosaedro.que además de envolver el ADN es de vital importancia para la infección de la célula hospedadora.

El genoma de los adenovirus consiste en una doble cadena de ADN lineal de aproximadamente 36kb. En cada extremo 5' de cada cadena existe una región invertida terminal (ITR) y una proteína terminal (TP) unida covalentemente (ambas estructuras son de gran importancia en el momento de replicación del ADN). Las unidades de transcripción pueden estar localizadas tanto en una como en otra cadena del ADN y no están organizadas de acuerdo a un principio discernible. Estas, originalmente se clasificaron de acuerdo a si el ARN_m (producto de la síntesis de las unidades de transcripción) es acumulado durante la etapa temprana (E, early) o tardía (L, late) de infección. En la región denominada temprana (E) encontramos una unidad de transcripción "temprana

inmediata" (E1A), cuatro unidades de transcripción "tempranas" (E1B, E2, E3 y E4), dos unidades de transcripción "temprana retardada" (IX y IVa2) y en la región denominada tardía (L) encontramos 5 unidades L (L1-L5). Todas las unidades de transcripción usan ARN polimerasa II celular para su transcripción. El genoma viral tiene también al menos, un gen que codifica para VA ARN (el VA ARN en la célula hospedadora tiene como blanco a PKR, esta proteína en condiciones normales estimula la síntesis de numerosas proteínas vitales de la célula). Algunos adenovirus contienen dos genes, dependiendo del serotipo y son transcritos por ARN pol III. El genoma de los adenovirus es un excelente ejemplo de un uso eficiente del limitado espacio genético para la producción del máximo número de proteínas necesarias, para la propagación del virus. Además, una vez dentro de la célula hospedadora manipulan la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de RNA de la célula, para su propio beneficio (Seth, 1999)

Conociendo la estructura básica del genoma de los adenovirus, se podrá comprender mejor la construcción de los mismos para el transporte de un gen de interés a la célula cardíaca.

Construcción de adenovirus

El método para la construcción de adenovirus de He y colaboradores (He, 1998; Luo, 2007), es llamado Ad-Easy System. Este método requiere un sistema de plásmidos vectores, la recombinación en *E. coli* y el empaquetamiento de los adenovirus en células empaquetadoras (por ej células 293 o 911).

El gen de interés (denominado transgen) es clonado mediante enzimas de restricción en un vector denominado "lanzadera" que es obtenido comercialmente, por ej el pAdTrack-CMV. Este vector además de contener los promotores necesarios contiene el gen de la proteína fluorescente verde GFP, que una vez expresada, se hace fluorescente si es excitada a una longitud de onda determinada. Una vez introducido el gen de interés, se procede a su linearización utilizando la endonucleasa de restricción *PmeI* y subsecuentemente se produce la cotransformación en *E. coli* con el vector adenoviral "backbone" pAdEasy-1, también obtenido comercialmente. Este plásmido adenoviral contiene el genoma del adenovirus excepto los genes E1 y E3 y además contiene el gen de resistencia al antibiótico kanamicina. Los

nuevos recombinantes son seleccionados por su resistencia al antibiótico kanamicina. Finalmente, el constructo adenoviral es clivado por la endonucleasa de restricción Pac1 y se transfecta en células empaquetadoras de adenovirus. Utilizando, como se mencionó antes, líneas celulares 293 o 911. Luego de 7 días aproximadamente los adenovirus son recolectados para su uso directo en experimentación o para su posterior amplificación en las mismas células empaquetadoras.

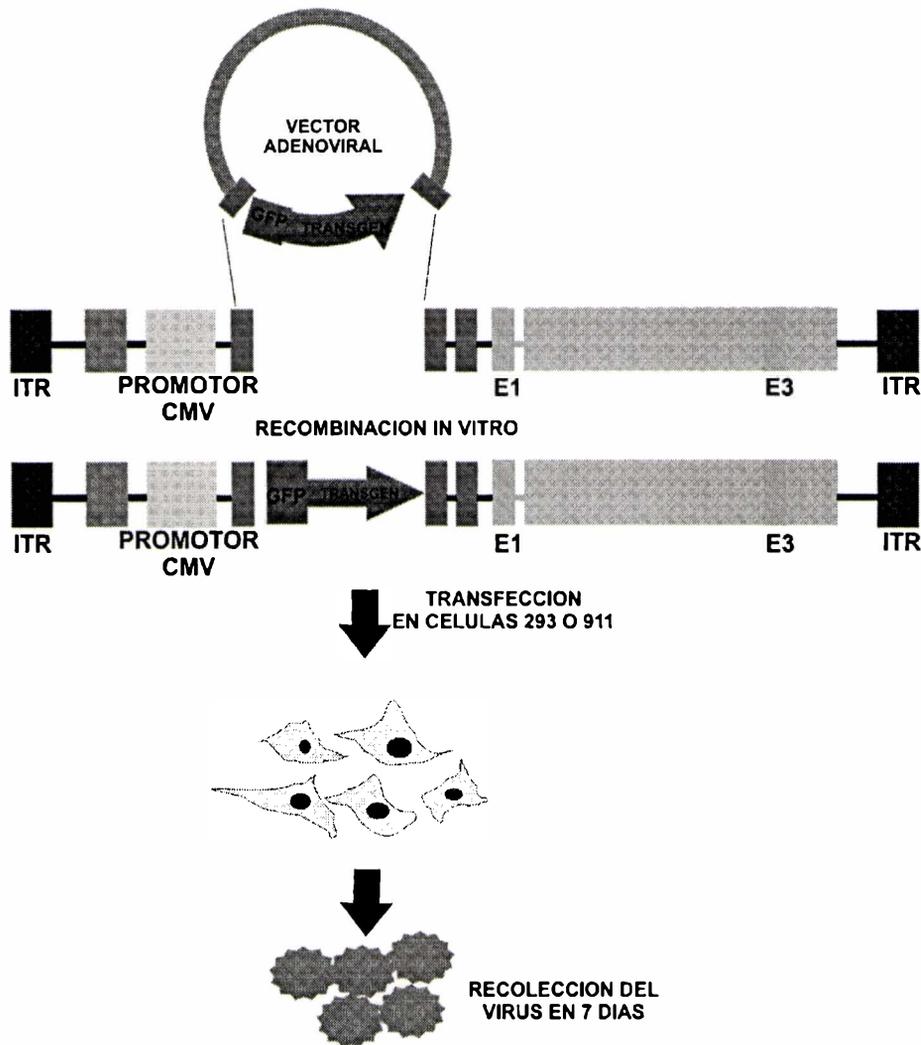


Figura 45. Esquema simplificado de la construcción de los adenovirus. El gen de interés es primero clonado en un vector comercial adenoviral "lanzadera". Subsecuentemente se cotransforma *in vitro* en *E. coli* y se seleccionan los recombinantes por resistencia a la kanamicina. Finalmente se transfectan en células empaquetadoras (por ej líneas celulares 293 o 911) y se recolectan los virus, luego de la lisis celular a los 7 días aproximadamente. En el esquema se representan las regiones tempranas E1 y E3, el promotor CMV, el gen de la GFP y el gen de interés.