

Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas

José Luis Reyes-Juárez,* Ángel Zarain-Herzberg*

Resumen

El retículo sarcoplásmico (RS) es el principal almacén de calcio intracelular en el músculo estriado y participa de forma importante en la regulación del proceso acoplamiento-excitación-contracción (AEC) en el músculo esquelético y cardíaco, regulando las concentraciones intracelulares de calcio durante la contracción y la relajación muscular. Esta regulación está dada por la interacción de las principales proteínas del RS que son el canal de liberación de calcio o receptor de rianodina, la ATPasa de Ca^{2+} , fosfolamban y calsequestrina. Por la relevancia del AEC en la fisiopatología de varias enfermedades cardíacas, se ha estudiado extensamente el papel que mantiene el RS y sus distintos componentes proteicos en distintas patologías, principalmente en la hipertrofia cardíaca, la insuficiencia cardíaca y en las arritmias hereditarias. Por lo anterior, las proteínas del RS constituyen un área de gran interés para el desarrollo de nuevas terapias, por lo que resulta de gran importancia el comprender la función del RS. En este artículo de revisión se analiza la estructura y función de las principales proteínas del RS, su papel en los procesos de contracción y relajación muscular, así como los cambios en expresión y función que ocurren en diferentes patologías cardíacas.

Palabras clave: Retículo sarcoplásmico. Corazón. Cardiomiocito. Hipertrofia. Insuficiencia cardíaca. Arritmias.
Key words: Sarcoplasmic reticulum. Cardiomyocyte. Cardiac hypertrophy. Heart failure. Arrhythmias.

Introducción

La contracción muscular es un proceso altamente regulado, que depende de la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y que en el músculo estriado se encuentra regulada primordialmente por el retículo sarcoplásmico (RS) que funciona como un almacén

Summary

FUNCTION AND ROLE OF THE SARCOPLASMIC RETICULUM IN HEART DISEASE

The sarcoplasmic reticulum (SR) constitutes the main intracellular calcium store in striated muscle and plays an important role in the regulation of excitation-contraction-coupling (ECC) and of intracellular calcium concentrations during contraction and relaxation. The regulation of ECC occurs due to the interaction among the main proteins of the SR that are the calcium release channel or ryanodine receptor, the Ca^{2+} -ATPase, phospholamban and calsequestrin. Due to the importance of ECC in the physiopathology of a number of cardiac diseases, the role of the SR and its components has been widely investigated in some pathologies, specifically cardiac hypertrophy, heart failure, and hereditary arrhythmias. Therefore, the SR proteins constitute an area of research of great interest for the development of new genetic and pharmacologic therapies; from this derives the importance of understanding the function of the SR. This review analyzes the expression, structure, and function of the main SR proteins, their role on myocardial contraction and relaxation and in the changes that occur in cardiac pathologies. (Arch Cardiol Mex 2006; 76: S4, 18-32)

de altas concentraciones de Ca^{2+} (0.5 a 2 mM). El RS es un extenso sistema de membranas intracelulares que rodea a cada miofibrilla, a manera de una cisterna llena de calcio. Cada miofibrilla se divide en estructuras sarcoméricas y el RS también se divide en compartimentos especializados.¹ Cada segmento de RS inicia y termina en una

* Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F.

Correspondencia: Ángel Zarain-Herzberg. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina, UNAM Apartado Postal 70-159, México, D.F. 04510 Tel. (5255) 5623-2258 FAX: (5255) 5616-2419 E-mail: zarain@servidor.unam.mx

cisterna terminal, que junto con la estructura membranosa llamada túbulo transverso (túbulo T) conforman las estructuras denominadas como tríadas o RS de unión (JRS). En el músculo cardíaco la tríada no está tan organizada con relación al túbulo T como lo está en el músculo esquelético, aunque las características estructurales esenciales de esta estructura se mantienen.^{2,3} Existen relativamente menos túbulos transversos en las células cardíacas, pero en general son de mayor diámetro, normalmente sólo están asociados en uno de sus lados a una cisterna terminal, por lo que las estructuras de tríadas son raras. Estas características morfológicas sugieren que el acoplamiento entre la excitación y contracción muscular (AEC) ocurre casi exclusivamente por señales originadas en las uniones triádicas en el músculo esquelético, mientras que en el cardiomiocito la liberación de Ca^{2+} del RS es inducida por el Ca^{2+} que entra por los canales tipo L voltaje dependientes.^{4,5} Las regiones del RS que no se encuentran en la cercanía de los túbulos T, se conocen como RS longitudinal (LRS) y está constituido por membranas tubulares ramificadas en el interior de la célula cuya función primordial es el transporte activo de Ca^{2+} al interior del RS durante la relajación muscular.⁶

Las principales proteínas que regulan la captación, almacenaje y liberación de Ca^{2+} en el RS tanto de músculo esquelético como cardíaco son la ATPasa de Ca^{2+} (SERCA), una proteína de alta capacidad de unión a Ca^{2+} llamada calsecuestrina (CSQ) y el canal de liberación de Ca^{2+} también conocido como receptor de rianodina (RyR).⁷⁻¹⁰ En el cardiomiocito, el AEC comienza cuando un estímulo despolarizante en el túbulo T activa al canal de calcio sensible a voltaje del sarcolema (receptor de dihidropiridina, DHPR), el cual permite la entrada de pequeñas cantidades de Ca^{2+} extracelular al citoplasma induciendo al canal RyR para que libere Ca^{2+} del interior del RS para elevar la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de ~20 nM hasta ~1 μM . La fuerza de contracción muscular está regulada por la unión de Ca^{2+} a la troponina C, que desencadena el entrecruzamiento de actina y miosina.¹¹ Durante la relajación muscular, el Ca^{2+} es transportado del citoplasma al RS principalmente por la ATPasa de Ca^{2+} (60-70%) y transportado al exterior por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (30-40%). Por tanto, la contracción y la relajación en miocitos cardíacos es regulada por las concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

El manejo anormal del calcio por el cardiomiocito, contribuye de manera predominante a la disfunción contráctil observada en la hipertrofia cardíaca severa y en la insuficiencia cardíaca. Ambos, la contracción y la relajación muscular se encuentran alteradas en los miocitos cardíacos de seres humanos y de modelos animales de insuficiencia cardíaca.¹²⁻¹⁶ Se ha demostrado que la disminución en la velocidad de acortamiento del miocito cardíaco durante la contracción se correlaciona tanto a la actividad reducida de ATPasa miofibrilar,¹⁷ así como a una concentración disminuida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.¹⁸⁻²⁰ Por lo tanto, es razonable asumir que *in vivo* el contenido de calcio del RS es bajo en la insuficiencia cardíaca y contribuye a la disminución de contractilidad y generación de fuerza del cardiomiocito.

Investigaciones recientes, indican que cambios en los movimientos de Ca^{2+} en el cardiomiocito es uno de los mecanismos más importantes en las alteraciones contráctiles del corazón enfermo.²¹ El manejo alterado de Ca^{2+} se traduce como una función miocárdica sistólica y/o diastólica anómala, como disparador de arritmias y es más evidente en frecuencias cardíacas elevadas. En esta revisión, se examina la función de las proteínas del RS en el AEC y las alteraciones del RS que han sido relacionadas con algunas enfermedades cardíacas.

Proteínas del retículo sarcoplásmico

Los principales componentes proteicos del retículo sarcoplásmico han sido bien caracterizados, particularmente los del JRS debido a la importancia de esta región en la fisiología de la contracción; los componentes de mayor importancia son el canal de liberación de Ca^{2+} o receptor de rianodina (RyR), la proteína calsecuestrina (CSQ), y algunas otras como la juntina y la triadina que participan en el anclaje de CSQ a la membrana del RS, además de participar en la regulación del RyR; existen otras proteínas como la calstabilina 2 que se une al RyR en su cara citoplásmica y contribuye a su regulación²² (Figs. 1 y 2). El otro componente de gran importancia en la estructura y función del RS es la ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA) junto con su proteína reguladora fosfolamban (PLB),²³ que se encuentra predominantemente en la zona del LRS. A continuación, se revisan individualmente cada una de las proteínas anteriormente mencionadas.

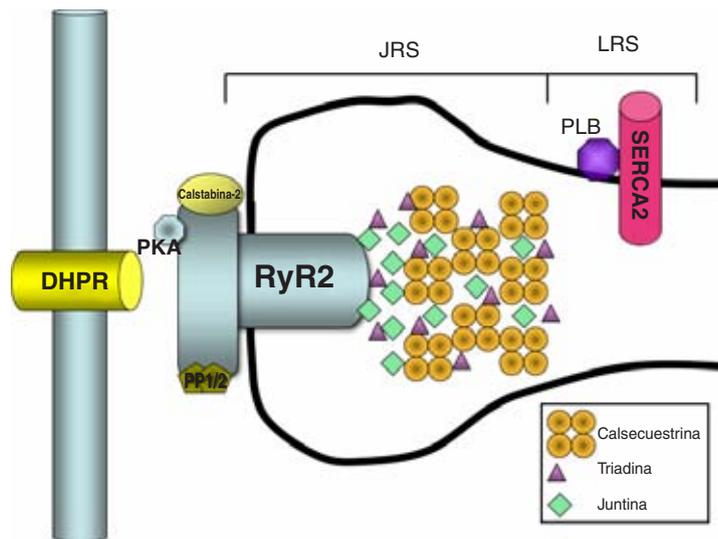


Fig. 1. El retículo sarcoplásmico y sus principales componentes. El canal de liberación de calcio (RyR), se encuentra en su conformación de homotetrámero en cercanía a los canales de calcio sensibles a voltaje (DHPR), en su superficie citoplásmica se encuentran los sitios de unión para calstabilina 2, fosfatasa 1 y 2 (PP1 y 2) y el sitio para fosforilación por proteína cinasa A (PKA), en su porción luminal el RyR se encuentra asociado a las proteínas de andamiaje triadina y juntina, que median la formación de un complejo multiproteico con la proteína calsecuestrina. En la porción longitudinal del RS se encuentra la ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA), junto con la proteína reguladora fosfolamban (PLB), la cual también tiene un sitio de fosforilación por PKA. JRS, retículo sarcoplásmico de unión; LRS, retículo sarcoplásmico longitudinal.

El canal de liberación de calcio

El canal de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RyR) es un componente central del AEC, que controla la salida de Ca^{2+} del RS, la cual activa y regula la contracción muscular. La estructura, función y regulación de los RyR han sido descritas a lo largo de la última década.²⁴ Los RyR pertenecen a una familia de canales de liberación de Ca^{2+} altamente conservada evolutivamente. Se han descrito tres isoformas de RyR codificadas por tres genes distintos (*Ryr1*, *Ryr2*, *Ryr3*); la isoforma RyR1 que se encuentra en el músculo esquelético de contracción rápida, la isoforma RyR2 que se expresa en músculo cardíaco y cerebro, y la isoforma RyR3 que se expresa en músculo liso y cerebro.²⁵⁻²⁷ Los RyRs se encuentran formando el canal de liberación de Ca^{2+} en tetrámeros, en esta conformación es el canal iónico de mayor dimensión descrito con un peso ~2000 kDa.²² Aproximadamente, 90% de cada una de las subunidades del canal, se encuentran formando una región amino-terminal, que protruye hacia el citosol y que tiene funciones reguladoras;²⁴ esta región inicialmente fue descrita como los “pies” del RyR por mi-

croscopía electrónica y habitualmente se encuentra en gran proximidad (120 Å) a los túbulos T y los canales tipo L de Ca^{2+} (DHPR).^{28,29} La región amino-terminal contiene varios dominios reguladores que controlan las propiedades de apertura del poro carboxilo-terminal, también la región amino-terminal le confiere propiedades de proteína de andamiaje al RyR localizando numerosas proteínas reguladoras clave del complejo. Cada una de las subunidades del RyR contiene sitios de unión para calmodulina (CaM), calstabilina 2 (previamente conocida como proteína de unión a FK-506; FKBP1-B), proteína cinasa A (PKA), fosfatasa 1 y 2 (PP1/PP2) y soricina.¹⁶ En la superficie luminal del RS se unen la calsecuestrina, triadina y juntina³⁰ (Fig. 1).

La regulación del RyR durante el ejercicio o estrés es mediada por la activación de receptores adrenérgicos- β acoplados a proteínas G, que median la activación de la adenilato ciclasa, lo que resulta en un incremento en los niveles de AMPc, lo que a su vez deriva en una activación de la PKA; la PKA entonces fosforila al RyR en un dominio conservado de cremallera de leucina/isoleucina;³¹ esta fosforilación provoca que la calstabilina 2 se disocie del complejo del canal, este fenómeno se asocia con una mayor probabilidad de apertura del canal RyR, y un aumento en la sensibilidad a la activación dependiente de Ca^{2+} .^{32,33} La integración de la activación simpática y la activación cardíaca por fosforilación del RyR mediada por PKA, es un mecanismo conservado evolutivamente que permite una adaptación rápida del gasto cardíaco durante el ejercicio o estrés súbito (la respuesta lucha-huida).³⁴ Las PP1/PP2 median la defosforilación del RyR, permitiendo que calstabilina 2 se vuelva a unir a RyR y restablecer las propiedades de apertura del canal. También, se ha observado que la PP1 disminuye la actividad del RyR. Se ha propuesto que la PP1 al estar unida al RyR, confiere estabilidad al RyR y promueve la apertura y cierre acoplados de grupos de RyRs que funcionan como unidades de liberación de Ca^{2+} .¹⁶ Por lo anterior, se sugiere que el desacoplamiento de RyR contribuye significativamente a la disminución del AEC observado en la insuficiencia cardíaca.¹⁶

La calsecuestrina

La calsecuestrina (CSQ) es la proteína más abundante en el interior del RS, en donde constituye la principal proteína que une Ca^{2+} y es capaz de

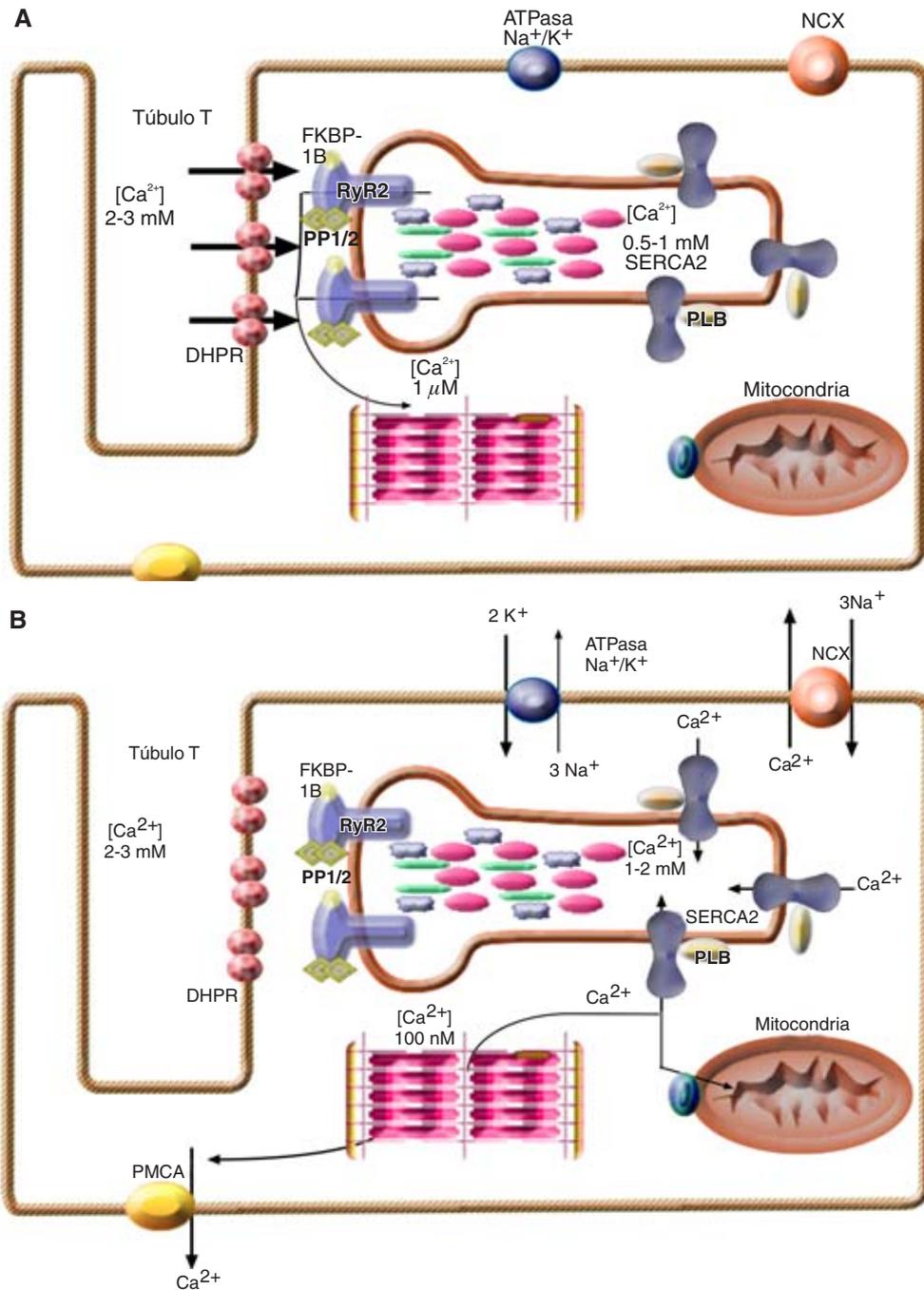


Fig. 2. El proceso del acoplamiento de excitación contracción y la relajación muscular.
A. El acoplamiento excitación contracción (AEC) se inicia cuando los canales de Ca^{2+} tipo L (DHPR) perciben la despolarización de la membrana celular, lo que los activa y permite la entrada de una pequeña cantidad de Ca^{2+} . Esta entrada de Ca^{2+} es percibida por el RyR, lo que provoca que se active y libere masivamente cantidades de Ca^{2+} las cuales aumentan rápidamente la concentración citoplásmica de Ca^{2+} hasta $1 \mu M$ con lo que se permite una interacción con la troponina C, y consecuentemente el entrecruzamiento de la actina y la miosina.
B. Una vez concluido el proceso de contracción, es necesario retirar el Ca^{2+} del citoplasma para regresar a las concentraciones basales y permitir el reposo, el proceso es llevado a cabo por dos proteínas, La ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA2), se encarga de regresar 60-70% del Ca^{2+} liberado al interior del RS, recargándolo para que tenga una cantidad suficiente de Ca^{2+} para liberar en el siguiente ciclo de AEC, por otro lado el intercambiador de Na^+/Ca^{2+} (NCX) se encarga del 30-40% del Ca^{2+} restante, transportándolo al exterior de la célula. En el proceso de retirar el Ca^{2+} también pueden intervenir un canal plasmático de Ca^{2+} (PMCA) y el transporte de Ca^{2+} al interior de la célula, aunque éstos tienen una contribución mínima.

almacenar calcio en una cantidad suficiente (0.5 a 2 mM) para permitir contracciones repetidas.²² Se encuentra asociada a la membrana del RS en las zonas de unión (JRS) en proximidad de los “pies” del RyR.⁶ Existen dos isoformas descritas de CSQ codificadas por genes distintos (*Casq1* y *Casq2*), la isoforma CSQ1 se encuentra en músculo esquelético de contracción rápida (100%), y también en músculo esquelético de contracción lenta (75% del total de CSQ); la isoforma CSQ2 se encuentra en el músculo esquelético de contracción lenta (25% del total de CSQ) y en el músculo cardíaco (100% del total de CSQ), comparten una gran similitud de aminoácidos entre las dos isoformas (84%) y alrededor de 80% a nivel del mRNA, y hasta el momento no se han descrito diferencias funcionales.^{22,35} La estructura y propiedades de la CSQ han sido descritas extensamente, es una glicoproteína ácida, que es capaz de formar polímeros lineales en respuesta a incrementos de la concentración de Ca^{2+} . Se encuentra localizada exclusivamente en las cisternas del JRS, no se ha encontrado en el LRS,⁶ se le observa en la proximidad de la membrana del RS aunque no está anclada a ésta, sino que se encuentra asociada a las proteínas juntina y triadina, que junto con el RyR forman un complejo multiproteico.³⁰ Se ha descrito que su función principal es como amortiguador de $[\text{Ca}^{2+}]$ para evitar que las altas concentraciones que se encuentran de este ion al interior del RS se precipiten. La CSQ tiene una gran capacidad para ligar Ca^{2+} (40-50 mol Ca^{2+} /mol CSQ) con una afinidad intermedia ($K_d \sim 1$ mM).³⁶ Además de este papel como amortiguador de Ca^{2+} , también se ha descrito la capacidad de la CSQ para regular la función de la liberación de Ca^{2+} del RyR.^{37,38} Recientemente, se ha descrito que la disociación de CSQ del complejo RyR/triadina/juntina es suficiente para que el canal se active;³⁹ en contraste, se ha demostrado que la interacción entre CSQ y el RyR independiente de triadina y juntina, activa el canal. Hasta el momento, no se han descrito las condiciones fisiológicas en las que CSQ interactúa con el RyR directamente o vía triadina/juntina (*Fig. 1*).

Se ha demostrado, que la concentración luminal de Ca^{2+} afecta directamente el nivel de activación del RyR y que el nivel de Ca^{2+} liberado es dependiente del nivel de “carga” de Ca^{2+} del RS.^{38,40} Al aumentar o disminuir la “carga” de Ca^{2+} del RS se aumenta o disminuye, respectivamente, la sensibilidad a la despolarización por

Ca^{2+} . Es en este aspecto, donde se ha encontrado una función adicional para la CSQ, debido a que se ha descrito que la respuesta del RyR a cambios en la concentración luminal de Ca^{2+} es mayor cuando la CSQ está asociada al complejo de RyR.^{22,37,40} También, se ha observado que los canales son sensibles a cambios de la concentración de Ca^{2+} luminal sólo en la presencia de triadina/juntina/CSQ, por lo tanto, la CSQ puede regular la liberación de Ca^{2+} por una interacción directa con el RyR, o regulando el tamaño del almacén funcional de Ca^{2+} en el RS.

A pesar de que no se han encontrado variaciones en la cantidad o en la actividad de CSQ en la hipertrofia cardíaca por sobrecarga de presión y en la insuficiencia cardíaca, se ha observado en ratones transgénicos que sobreexpresan CSQ2 en el corazón, el desarrollo de hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca,⁴¹ lo que se sugiere que la CSQ2 puede tener un papel que aún no ha sido determinado en el AEC que interviene en la patogénesis de la hipertrofia cardíaca.

Como se mencionó previamente, la CSQ no se encuentra anclada a la membrana del RS, sino que por medio de interacciones con la triadina y la juntina se asocia al RyR, las cuatro proteínas forman un complejo central para la liberación de Ca^{2+} .²⁴ La triadina fue la primera de las proteínas de anclaje en ser descrita, es una glicoproteína de 95 kDa, que se encuentra embebida en la membrana del JRS, la mayor parte de la proteína se encuentra en la luz del RS; la triadina por sí misma es capaz de inhibir al RyR al unirse al dominio citoplásmico de éste, pero no tiene ningún efecto al unirse al dominio luminal del canal, debido a esto se cree que las interacciones normales entre RyR y triadina no afectan la actividad del canal.^{42,43} En ratones, se ha observado que la sobreexpresión de triadina se asocia con hipertrofia cardíaca, relajación anormal y contractilidad disminuida en frecuencias de estimulación menores a la frecuencia cardíaca normal.^{44,45} La sobreexpresión de triadina también se asocia con una reducción de los niveles de juntina y RyR; y aunque el papel fisiológico de la triadina no ha sido bien elucidado, es evidente que está muy relacionado con la expresión de otras proteínas que participan en el manejo de Ca^{2+} y que tiene un papel relevante en la liberación de Ca^{2+} por el RS.⁴⁴ La juntina es otra proteína de anclaje al RS para la CSQ y de interacción con el RS, fue descrita varios años después que la triadina y ha sido mucho menos estudia-

da, es más pequeña que la triadina, con una masa molecular de 26 kDa.²² En contraste con la triadina, sólo el dominio luminal se une al RyR y esta interacción no requiere Ca^{2+} . En estudios donde se ha sobreexpresado juntina para tratar de elucidar su papel fisiológico, se ha observado una contracción muscular alterada, un adelgazamiento del JSR, compactación de la CSQ y un incremento en las uniones del RS y los túbulos T.⁴⁶

La ATPasa de Ca^{2+}

Las ATPasas de Ca^{2+} del RS (SERCA) son proteínas de ~110 kDa y pertenecen a la familia de enzimas altamente conservadas (ATPasas tipo E1-E2), son enzimas dependientes de ATP que transportan Ca^{2+} activamente hacia el interior del RS.⁴⁷ La familia de bombas de calcio SERCA consta de tres genes homólogos llamados SERCA1, SERCA2 y SERCA3.⁴⁸⁻⁵⁰ El gen SERCA1 (*ATP2A1*) se expresa en el músculo esquelético de contracción rápida y codifica un pre-ARNm que por empalme alternativo produce dos isoformas cuya expresión se regula durante el desarrollo, la SERCA1a o isoforma adulta y la SERCA1b o isoforma neonatal.⁴⁸ El gen SERCA2 (*ATP2A2*) codifica para tres isoformas producidas por mecanismos de empalme alternativo del transcrito primario llamadas SERCA2a, SERCA2b y SERCA2c, que también se expresan de manera tejida específica.⁴⁹ La isoforma SERCA2a se expresa predominantemente en el músculo cardíaco y en menor cantidad en el músculo esquelético de contracción lenta, aunque también se expresa en niveles más bajos en el músculo liso y tejidos no musculares.⁵¹ La isoforma SERCA2b se expresa de forma ubicua en la mayoría de los tipos celulares principalmente en músculo liso y células no musculares. La isoforma SERCA2c descubierta recientemente, se ha reportado que se expresa durante la diferenciación monocítica.⁵² El gen SERCA3 (*ATP2A3*) codifica para seis isoformas producidos por empalme alternativo del pre-ARNm que se expresan predominante en las células epiteliales y de origen hematopoyético.⁵³ SERCA2a se encuentra principalmente en el LRS, y participa en el bombeo de Ca^{2+} del citoplasma hacia el interior del RS durante la relajación muscular. SERCA2a cataliza el gradiente electrogénico de 2 iones de Ca^{2+} por una molécula de ATP hidrolizada; SERCA2a tiene una afinidad alta por Ca^{2+} ($K_m \sim 0.1 \mu\text{M}$) y es capaz

de mantener la concentración citosólica en reposo de 10-20 nM.^{11,54} La densidad de SERCA2a en el RS es muy alta ($30,000/\mu\text{m}^2$) y el 80% del contenido de proteínas es SERCA2a, debido a esto sólo son necesarios 1 ó 2 ciclos de transporte de Ca^{2+} para recuperar la concentración de Ca^{2+} citoplásmica durante la relajación muscular.¹¹

En el cardiomiocito, SERCA2a es regulada por fosfolamban (PLB), una proteína de 52 aminoácidos con un peso de 6.1 kDa, que forma un homopentámero que tiene tres dominios citosólicos, el dominio 1a (aminoácidos 1-20) donde se encuentran los sitios para fosforilación por PKA (Ser 16) y por la cinasa de Ca/CaM (Thr 17), el dominio 1b (aminoácidos 21-30) es rico en aminoácidos amidados y el dominio II que atraviesa la membrana del RS. Cuando PLB se encuentra defosforilado es un inhibidor de la actividad de SERCA2, se ha demostrado que la fosforilación por la cinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina (CaMKII) resulta en un incremento de la actividad de SERCA. La fosforilación de PLB, está dada normalmente por la activación de receptores β -adrenérgicos, que se encuentran acoplados a proteínas G y a través de la activación de la adenilil ciclasa se incrementan los niveles de AMPc que activan a la PKA, la cual tiene como uno de sus blancos a PLB. La fosforilación de PLB reduce su interacción con SERCA2, lo que resulta en aumento de la V_{max} de SERCA2 para el transporte de Ca^{2+} .^{23,55}

El acoplamiento excitación contracción

El acoplamiento entre la excitación y contracción muscular (AEC) es el mecanismo que acopla la despolarización del sarcolema con la liberación de Ca^{2+} del RS, es un proceso que depende de la interacción entre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L (DHPR) y los canales de liberación de Ca^{2+} del RS (RyR). La liberación de Ca^{2+} por el RS es esencial en la actividad cardíaca y es el activador directo de los miofilamentos que llevan a cabo la contracción; el manejo incorrecto de $[\text{Ca}^{2+}]$ por los cardiomiocitos es una de las principales causas de disfunción contráctil y arritmias en condiciones patológicas.^{56,57}

Durante el potencial de acción, el Ca^{2+} entra a la célula por la activación de los canales tipo L (DHPR) debida a la despolarización, lo que provoca una corriente entrante de Ca^{2+} (I_{Ca}), la entra-

da de una cantidad pequeña de Ca^{2+} es detectada por el canal RyR y resulta en la activación de éste, lo que permite que los RyRs se abran y permitan la salida de una cantidad masiva y rápida de Ca^{2+} del RS, la combinación del Ca^{2+} entrante por el canal DHPR y el liberado del RS incrementa rápidamente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que permite la unión del Ca^{2+} con la troponina C, lo que a su vez permite la activación de la maquinaria contráctil.⁵⁸ Recientemente se han descrito otros dos mecanismos que pueden inducir la liberación de Ca^{2+} del RS; el primero es a través de canales tipo T de Ca^{2+} , el segundo es por medio del NCX, al invertir el flujo y generar una entrada de Ca^{2+} tanto por un aumento de la concentración de Na^+ citosólico y/o por una despolarización; sin embargo ambos mecanismos son menos efectivos en provocar la liberación de Ca^{2+} por el RS, en comparación con el DHPR y su papel fisiológico es poco claro.⁵⁹ Los canales DHPR son activados por la despolarización y son inactivados en una forma Ca^{2+} dependiente, lo que limita la cantidad de Ca^{2+} que entra a la célula por el potencial de acción, esta inactivación dependiente de Ca^{2+} es mediada por CaM unida al extremo carboxilo-terminal del canal DHPR. Generalmente, la zona donde se encuentran los canales DHPR está en proximidad al JRS, donde se encuentran los canales RyR, con lo que funcionalmente se facilita la activación de éstos, la apertura de un canal DHPR asociado a un canal RyR (couplón) asociando 2-4 iones Ca^{2+} al RyR es suficiente para activar totalmente el proceso de liberación en ese couplón, los RyR que se encuentran en la periferia de un couplón, pueden activarse ya sea por una concentración local alta de Ca^{2+} ($>10 \mu\text{M}$) o por un acoplamiento con el RyR del couplón, con lo que se tiene un mecanismo de todo o nada, pero debido a que la concentración de Ca^{2+} entrante decae rápidamente entre couplones, conlleva a que la activación no se propague; un mecanismo que funciona para generar un margen de seguridad es la asociación de más de un canal de RyR por couplón (10-25 DHPR/100 RyR) con lo que se asegura que cada couplón dispare y propague el impulso inicial^{56,57} (Fig. 2). Una vez que se ha llevado a cabo la contracción muscular, es necesario que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, regrese a sus niveles en reposo (10-20 nM), para permitir la relajación muscular, en el proceso de retirar el Ca^{2+} del citoplasma, hay 2 mecanismos fundamentales en mamíferos, uno está dado por SERCA2a mencionado previamente, que se encarga de transportar activamente el Ca^{2+} al inte-

rior del RS, el otro mecanismo de importancia es el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), el cual desplaza por gradientes Ca^{2+} hacia el exterior de la célula, y desplaza Na^+ al interior de la célula. Existen además otros mecanismos que pueden contribuir al movimiento del Ca^{2+} , como son las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PM-CAs) y los transportadores mitocondriales de Ca^{2+} , sin embargo su contribución para restituir la concentración normal de Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ total en la relajación durante condiciones fisiológicas normales es mínima. En condiciones fisiológicas en el corazón humano, SERCA2 desplaza ~60% del Ca^{2+} de vuelta al interior de RS y el NCX moviliza ~40% del Ca^{2+} restante al espacio extracelular, aunque estos porcentajes varían de especie a especie y pueden modificarse en condiciones patológicas.^{56,57}

La liberación de Ca^{2+} del RS inducida por Ca^{2+} (LCIC) en cardiomiocito es un mecanismo de retroalimentación positiva, pero su inactivación es necesaria para la recarga diastólica, por lo que se han propuesto tres mecanismos para esta inactivación: 1) la depleción del RS de Ca^{2+} , 2) la inactivación o adaptación del RyR y 3) el agotamiento estocástico. El agotamiento estocástico se refiere a que todos los canales DHPR y RyR se cierran simultáneamente, la corriente entrante de Ca^{2+} decae rápidamente y se interrumpe el proceso de liberación; este mecanismo es poco probable de ocurrir debido al número de canales que se activan normalmente. La depleción local de Ca^{2+} no es capaz de explicar en su totalidad la inactivación de la LCIC debido a que se han observado que después de tiempos prolongados ($> 200 \text{ ms}$) la cantidad de Ca^{2+} liberado por el RS no disminuye. Se han propuesto dos formas de inactivación de RyR, ambas dependientes de Ca^{2+} , una es la inactivación por absorción en la que el RyR es incapaz de reabrirse hasta que se recupera, y la otra es por adaptación en la que después de activarse, las probabilidades de apertura del canal son menores, pero aún es posible que se abra ante una corriente mayor de Ca^{2+} entrante. Hasta el momento no se ha determinado si sólo uno de estos mecanismos es relevante y existen pocos estudios que arrojen datos concluyentes.⁵⁶⁻⁵⁹

Papel del retículo sarcoplásmico en las enfermedades cardíacas

Como se mencionó anteriormente el RS tiene un papel fundamental en el proceso de AEC, debido

a esto se han realizado varios estudios para elucidar el papel de los distintos componentes antes mencionados en el desarrollo y progresión de las enfermedades cardíacas, su papel particularmente ha sido estudiado en la hipertrofia cardíaca, la insuficiencia cardíaca (IC) y en las arritmias.^{21,60} A continuación se revisa el conocimiento actual del papel del RS en estas patologías.

Hipertrofia e insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca es un desorden complejo que lleva a una alteración del bombeo de la sangre a los tejidos para satisfacer las demandas metabólicas del cuerpo, en un corazón que ha sufrido un estímulo nocivo (ej. hipertensión, isquemia miocárdica, miocardiopatía dilatada) la IC se desarrolla si la lesión persiste por un período prolongado.⁶¹ La mayor parte de los datos señalan que esto es como consecuencia de una depresión de la contractilidad del miocardio que no es compensada por un aumento de la masa muscular. Por esta razón, el proceso contráctil en el corazón insuficiente ha sido estudiado ampliamente.

Las bases celulares y moleculares de la IC han sido estudiadas extensamente, y aunque no existe una teoría patogénica única, se han descrito múltiples alteraciones bioquímicas. Existe un consenso que la eficiencia de bomba del corazón, se encuentra reducida en la IC sistólica, que ocurre en la enfermedad isquémica y en la miocardiopatía dilatada, el trabajo del ventrículo izquierdo está disminuido aun cuando su consumo energético es cerca de lo normal.⁶¹

Existe evidencia importante de que en la IC se presentan cambios en proteínas sarcoméricas, estos datos incluyen cambios tanto a nivel de expresión de ARNm como de proteína de las isoformas de la cadena pesada de miosina α y β , alteraciones en la expresión de troponina T y de isoformas de la cadena ligera de miosina 1;⁶²⁻⁶⁵ en cada uno de estos casos el cambio de expresión representa una inducción de la actividad de ATPasa de la miosina de los miofilamentos y en la velocidad de contracción.⁶⁶ Aunque este cambio en la velocidad de contracción pudiera interpretarse como un cambio adaptativo energéticamente favorable, el resultado final es un aumento en la tensión de la pared y una activación neurohumoral y de citocinas dañinas, secundarias a la reducción del volumen sistólico y un incremento en el volumen ventricular telediastólico.⁶⁷

Una gran cantidad de evidencia ha demostrado que el movimiento intracelular de Ca^{2+} alterado juega un papel central en el desarrollo de la IC.¹⁶ Estudios recientes, han mostrado una relación estrecha entre alteraciones del manejo del Ca^{2+} y la progresión de la IC, en varios casos las alteraciones del manejo del Ca^{2+} preceden a la depresión mecánica. Se cree que una gran parte del déficit contráctil es debido a una disminución de la cantidad de Ca^{2+} liberado, y un factor central limitando la cantidad de Ca^{2+} liberado es la disminución del contenido de Ca^{2+} del RS.^{21,68} Las alteraciones en el AEC se encuentran en varias formas de IC, las anomalías de receptores, bombas y proteínas responsables de los movimientos intracelulares han sido descritos en la IC; el resultado de estas alteraciones es una prolongación de los transientes de Ca^{2+} y un aumento de la concentración diastólica de Ca^{2+} , lo que funcionalmente se traduce en una relajación inadecuada y en una contracción insuficiente por la depleción de Ca^{2+} al interior del RS.⁶⁹

La mayor parte de los casos de IC están precedidos por una hipertrofia celular y ventricular, que inicialmente representa un mecanismo de adaptación al estrés hemodinámico, entre los beneficios de esta hipertrofia se encuentra el aumento de elementos contráctiles, una disminución en la tensión de la pared por el incremento del grosor de ésta en la hipertrofia concéntrica, así como un aumento del volumen sistólico por el aumento del volumen telediastólico en la hipertrofia excéntrica.⁷⁰ La persistencia del estímulo estresante, desencadena en una hipertrofia patológica, que es cuando se acompaña la hipertrofia de una disfunción en la contracción.⁷¹ Esta condición se da cuando el estrés hemodinámico es censado por los miocitos cardíacos y conlleva cambios en la expresión de genes. Se ha propuesto que la deformación mecánica activa los canales iónicos del sarcolema; debido a que el Ca^{2+} intracelular es un regulador de la hipertrofia, en gran medida por la activación de la vía de la fosfatasa calcineurina, la activación de estos canales puede ser uno de los estímulos para la generación de hipertrofia patológica.⁷² Existen otras vías para la generación de hipertrofia, aunque se ha demostrado que la activación de la vía de calcineurina/NFAT está asociada a la aparición de hipertrofia patológica.⁷³ Varios grupos de investigación han documentado en modelos animales de hipertrofia cardíaca patológica severa inducida por sobrecarga de presión y en

pacientes con insuficiencia cardíaca, que la expresión de SERCA2 se encuentra disminuida y que los niveles disminuidos del ARNm de SERCA2 representan una transcripción reducida del gen.⁷⁴⁻⁷⁶ Por lo tanto, se puede sugerir que una transcripción disminuida del gen SERCA2 conduce a una regulación alterada de la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ mioplásmico, y en última instancia a la activación de la vía de calcineurina/NFAT para la inducción de la hipertrofia cardíaca.

El contenido de Ca^{2+} dentro del RS, es un reflejo del balance entre la recaptura de Ca^{2+} del RS por SERCA2 y la extrusión de Ca^{2+} por el RyR, por lo que el contenido reducido de Ca^{2+} es debido a una menor cantidad de Ca^{2+} bombeado al interior del RS ya sea por disminución de la actividad o de la cantidad de SERCA2, o también puede deberse a una fuga de Ca^{2+} por los canales RyR. Ambas hipótesis han sido respaldadas por datos experimentales. Los movimientos transmembranales de calcio también pueden afectar el contenido total del Ca^{2+} del RS, ya sea por una entrada menor por los canales de Ca^{2+} de DHPR, o por una mayor actividad del NCX, en este sentido la mayor parte de los estudios ha indicado que la actividad de los canales DHPR está poco afectada en la IC. Por otra parte, la mayor parte de los estudios indican que existe un incremento en la expresión y la función del NCX, este incremento de función del NCX puede competir con SERCA2 durante la relajación, retirando más Ca^{2+} del citosol y evitando que el RS se recargue completamente. Un fenómeno que recientemente ha atraído atención es la fuga diastólica de Ca^{2+} sin un estímulo, debido a un aumento en la probabilidad estocástica de apertura del canal⁷⁷ (Fig. 3).

La disminución de SERCA2 ya sea en su expresión o en su función, aunque no está completamente consensuada, es sostenida por la mayor parte de los estudios, PLB que es el regulador natural de SERCA2, se ha encontrado que está reducido en su expresión, aunque algunos estudios no han encontrado cambios en su expresión, sin embargo, la relación SERCA2/PLB siempre se encuentra disminuida, lo que se traduce en una disminución de la función de SERCA2 en la IC. Durante la hipertrofia cardíaca y la IC, también se observan cambios en la regulación de SERCA2, derivado de la estimulación adrenérgica crónica que se observa en estas patologías, hay un aumento en la activación de los receptores adrenérgicos- α que están acoplados

a proteínas Gq, las cuales a su vez activan a la fosfolipasa C, que aumenta los niveles de diacilglicerol, activando a la proteína cinasa C- α (PKC- α), que es capaz de fosforilar al inhibidor de la fosfatasa-1 (I-PP1), disociándolo de ésta y permitiendo que PP1 defosforile a PLB, lo que contribuye a una disminución de la actividad de SERCA^{16,78,79} (Fig. 3 y Tabla I).

Como se mencionó anteriormente, el complejo macromolecular del RyR incluye a la PKA, PP1, PP2a y calstabilina 2; se ha reportado que en la IC el RyR se encuentra hiperfosforilado por PKA, lo que es atribuido al estado hiperadrenérgico y a la pérdida de las fosfatasas asociadas al RyR (PP1/PP2a), el estado hiperfosforilado provoca la disociación del calstabilina 2, la cual como se mencionó anteriormente confiere estabilidad al RyR y al no estar unida al canal RyR, este último tiene una mayor probabilidad de aperturas y una menor conductancia, lo que resulta en un aumento del flujo iónico; esto se manifiesta con fuga diastólica de Ca^{2+} del RS y la consecuente reducción del contenido de Ca^{2+} total del RS.^{60,80-82}

Los datos en relación al papel de SERCA2/PLB en la IC, también son apoyados por datos arrojados de modelos animales en los que se han utilizado terapias experimentales para la IC, que tienen como objetivos a SERCA2 y/o PLB y se ha encontrado mejoría o incluso regresión de la IC. Las terapias experimentales que han arrojado estos datos, principalmente han sido la transferencia de genes quiméricos para sobreexpresar SERCA2a por medio de vectores adenovirales deficientes en replicación, lo que se traduce en un incremento en la cantidad de Ca^{2+} recapturado por el RS^{83,84} y una mejoría en la contractilidad; en este sentido también se han realizado intervenciones con fármacos como es el etomoxir,⁷⁵ que aumenta la expresión de SERCA2. Otra intervención en este mismo componente del AEC ha sido la transferencia de ARNm antisentido de PLB para disminuir su expresión, lo que también ha arrojado datos favorables mejorando la cantidad de Ca^{2+} en el RS y la contractilidad,⁸⁵⁻⁸⁷ debido a estas observaciones, tanto SERCA2 y PLB se erigen como blancos importantes en nuevas terapias para la hipertrofia cardíaca y la IC.

Las arritmias

Las arritmias ventriculares fatales ocurren principalmente en pacientes con IC, pero también pueden presentarse en pacientes aparentemente

sanos con un corazón sin anomalías estructurales, así como con síndromes arritmogénicos hereditarios.^{88,89}

El mecanismo de estas arritmias ha sido extensamente investigado y se ha propuesto que la generación del impulso que inicia las arritmias ventriculares puede originarse por reentrada o por un actividad disparada (ocurre a continuación de un potencial de acción previo). Los impulsos disparados resultan de despolarizaciones de la membrana, también llamadas “trasdespolarizaciones”, y se han descrito dos tipos, las tempranas (TDP) y las tardías (TDT).⁹⁰⁻⁹²

Las TDP se generan durante el potencial de acción, son definidas con oscilaciones en el nivel de meseta del potencial de membrana o durante la fase 3 de la despolarización; generalmente

ocurren durante una repolarización prolongada por alteraciones en las corrientes de K⁺, prolongación del intervalo QT por fármacos, anomalías metabólicas (hipokalemia) o alteraciones estructurales del corazón (hipertrofia). Se ha propuesto la hipótesis de que son generadas por la reapertura de canales tipo L o canales de Na⁺ durante la fase de meseta del potencial de acción.^{91,92} Por otra parte las TDT se definen como una oscilación del potencial de membrana que se presenta después de la repolarización completa de un potencial de acción, es más común que se presenten durante frecuencias cardíacas incrementadas, tono simpático aumentado o sobrecarga intracelular de Ca²⁺.⁹⁰

Durante la IC, las condiciones estructurales y electrofisiológicas alteradas del cardiomiocito

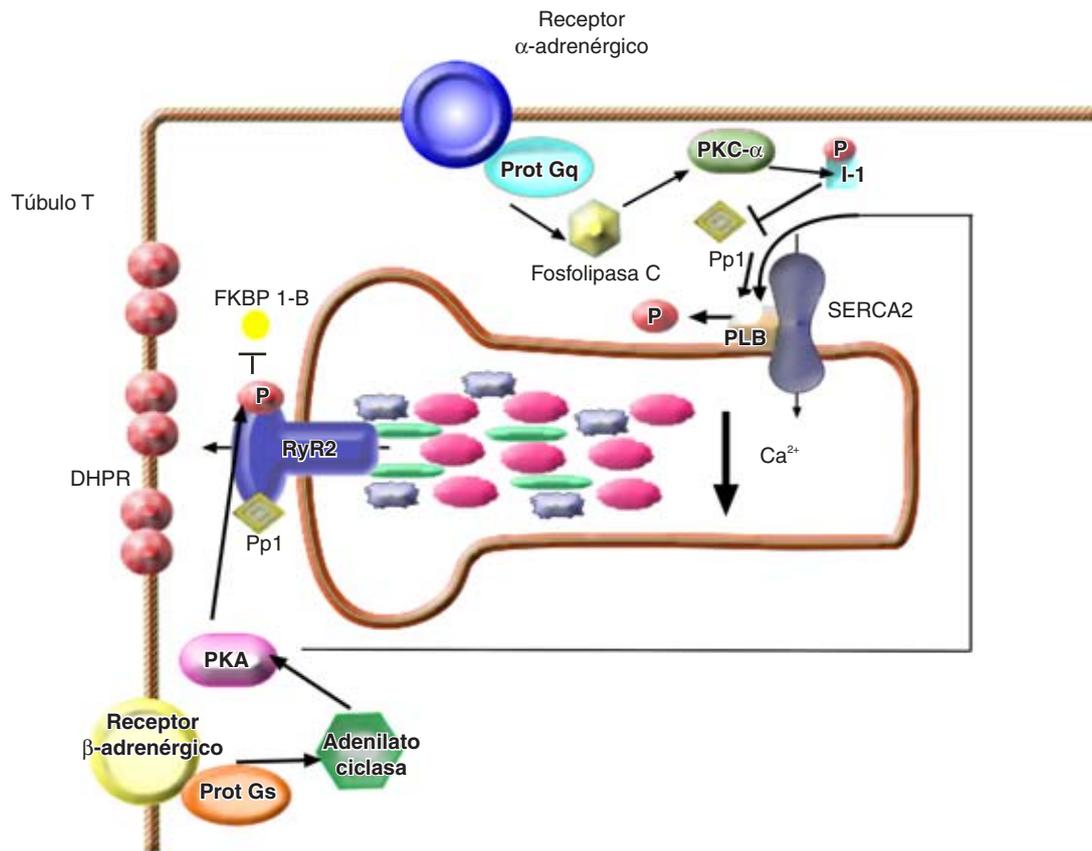


Fig. 3. Alteraciones en el retículo sarcoplásmico en la hipertrofia patológica y en la insuficiencia cardíaca. Durante los estados en donde se encuentra hipertrofia patológica e insuficiencia cardíaca, la relación entre SERCA2a y PLB (SERCA2a/PLB) se encuentra disminuida, lo que se traduce en una disminución de la actividad total de SERCA2 y consecuentemente en la cantidad total de Ca²⁺ al interior del RS, esto provoca que la cantidad de Ca²⁺ liberada durante cada ciclo de AEC, sea menor a la habitual, lo que provoca que la contracción sea inadecuada. Por otra parte el RyR se encuentra hiperfosforilado por la estimulación adrenérgica crónica lo que provoca que tenga una mayor probabilidad de apertura y fuga Ca²⁺ durante la diástole, lo que contribuye a que exista una menor cantidad de Ca²⁺ al interior del RS disponible para ser liberado. PKA, proteína cinasa A; PKC-α, proteína cinasa C-alfa; PP1, proteína fosfatasa-1; FKBP1-B, calstabilina 2.

Tabla I. Cambios en la concentración de las proteínas del retículo sarcoplásmico en la insuficiencia cardíaca.

Proteína	Cambio*
Canal de Ca ²⁺ tipo L (DHPR)	↔
Canal de liberación de Ca ²⁺ (RyR)	↔
ATPasa de Ca ²⁺ del RS (SERCA2)	
Fosfolamban (PLB)	↑
Calsecuestrina (CSQ2)	↔
Intercambiador Na ⁺ / Ca ²⁺ (NCX)	↑

* ↑ Aumento; ↓ disminución; ↔ sin cambio.

proveen de la base para una contracción inadecuada o arritmias fatales en los pacientes con esta entidad.^{34,93} De estas alteraciones, una de las más documentadas tanto en humanos como en modelos animales es la prolongación en el tiempo del potencial de acción durante frecuencias cardíacas bajas; en esta condición se observan cambios en las corrientes de salida y un retraso en las corrientes rectificadoras de K⁺, además de una repolarización retardada, hay un aumento en la dispersión de la duración del potencial de acción y una refractoriedad que puede predisponer a arritmias reentrantes.⁹⁴ Hay que señalar que la reentrada no es el único mecanismo que provoca arritmias en pacientes con IC, ya que en pacientes con IC por isquemia también es importante la actividad disparada, en este caso involucra tanto TDP como TDT, la actividad aumentada del NCX puede estar involucrada en la génesis de las TDP por un incremento de la carga de Ca²⁺ por la función invertida por la prolongación del potencial de acción o por la liberación espontánea de Ca²⁺ por el RS, la cual inicia una corriente de entrada; en el caso de las TDT se piensa que disparan arritmias no reentrantes en IC.^{95,96}

Durante la IC, también se han descrito arritmias generadas por alteraciones en el RyR, como ya se mencionó el RyR es estabilizado por calstabilina 2, y durante la IC hay una estimulación β -adrenérgica crónica, que se asocia a un estado activado de PKA que fosforila al RyR evitando la unión de calstabilina 2, y una disminución de los niveles de las fosfatasa PP1 y PP2; todo esto da como resultado un aumento en la sensibilidad del RyR a Ca²⁺, y un desplazamiento hacia la izquierda, lo que provoca que la liberación por el RyR haga más susceptible la aparición de arritmias ventriculares.^{77,97,98}

Recientemente mutaciones en el canal RyR, han sido asociadas a muerte súbita cardíaca en cora-

zones estructuralmente normales. Se describió inicialmente en familias italianas y finlandesas con historia de muerte súbita, un patrón reproducible de arritmias ventriculares durante estrés o ejercicio. Estas entidades han sido denominadas como taquicardia ventricular polimórfica familiar (TVPF), además se han descrito otras 20 mutaciones en el gen de RyR que se han asociado con la taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas (TVPC);^{99,100} ambas se caracterizan por taquicardias ventriculares bidireccionales o polimórficas inducidas por el ejercicio. Ambas tienen una mortalidad de 50% a los 30 años, siendo la muerte súbita su manifestación inicial más frecuente. Otra condición asociada a mutaciones del RyR pero de diferente forma clínica es la displasia/miocardiopatía ventricular derecha arritmogénica tipo 2 (D/MVDA2), que se manifiesta por reemplazo progresivo de la pared ventricular derecha con tejido fibroso y graso;¹⁰¹ y tiene en común con la TVPF y TVPC arritmias inducidas por ejercicio y muerte súbita. También se han asociado mutaciones en el gen de CSQ2 con la TVPC.²⁴ El mecanismo molecular asociado a estas entidades, ha sido señalado como una disminución en la afinidad del RyR por calstabilina 2, que es más notoria durante la estimulación adrenérgica y la subsiguiente fosforilación del RyR por PKA y que aunada a la disminución de la afinidad por calstabilina 2, provoca una mayor disociación, y por lo tanto el canal de RyR es mucho menos estable, y más susceptible de generar liberaciones aberrantes de Ca²⁺ que se traduzcan en arritmias.^{22,89,102,103}

Conclusiones

El retículo sarcoplásmico es un organelo de las células musculares estriadas que ha sido extensamente estudiado y que tiene un papel central en el proceso del AEC, donde varios de sus componentes mantienen funciones esenciales para el desarrollo de la contracción miocárdica. La expresión y función de las proteínas del RS se encuentra regulada finamente, en particular los dos componentes de mayor importancia que son el canal de liberación de Ca²⁺ (RyR) y la ATPasa de Ca²⁺ (SERCA2a), que junto con los canales de Ca²⁺ voltaje dependientes (DHPR) y el intercambiador de Na⁺ y Ca²⁺ (NCX), son los componentes centrales que disparan la contracción muscular. Además la calsecuestrina, triadina y juntina presentes en la luz del RS participan activamente en el proceso de liberación de Ca²⁺.

Debido a este papel fundamental, se ha demostrado que las proteínas del RS también juegan un papel muy importante en el desarrollo y progresión de enfermedades cardíacas, donde la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca han sido las más estudiadas. La mejor comprensión de la estructura y función y expresión de las proteínas del RS dan la pauta para comprender la fisiopatología de la hipertrofia cardíaca por exceso de presión, la IC y las arritmias, así como el poten-

cial que representan para futuras intervenciones terapéuticas.

Agradecimientos

Agradecemos los valiosos comentarios de los Drs. Jaime Mas Oliva y Edmundo Chávez Cosío durante la preparación de este manuscrito. Este trabajo fue apoyado por los donativos de SEP-CONACYT 42801, y PAPIIT-UNAM, IN-215002, México.

Referencias

- JORGENSEN AO, KALNINS VI, ZUBRZYCKA E, MACLENNAN DH: *Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Localization by immunofluorescence of sarcoplasmic reticulum proteins in differentiating rat skeletal muscle cell cultures*. J Cell Biol 1977; 74: 287-298.
- PAGE E: *Quantitative ultrastructural analysis in cardiac membrane physiology*. Am J Physiol 1978; 235: C147-158.
- VAN WINKLE WB, ENTMAN ML: *Comparative aspects of cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum*. Life Sci 1979; 25: 1189-1200.
- FABIATO A, FABIATO F: *Calcium and cardiac excitation-contraction coupling*. Annu Rev Physiol 1979; 41: 473-484.
- FABIATO A: *Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum*. Am J Physiol 1983; 245: C1-14.
- FRANZINI-ARMSTRONG C, PROTASI F, TUISKENS P: *The assembly of calcium release units in cardiac muscle*. Ann N Y Acad Sci 2005; 1047: 76-85.
- MICHALAK M, MACLENNAN DH: *Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Biosynthesis of the high affinity calcium binding protein in rat skeletal muscle cell cultures*. J Biol Chem 1980; 255: 1327-1334.
- BRANDT NR, BRUNSCHWIG JP, LATTANZIO FA: *A functional identification of cardiac junctional sarcoplasmic reticulum*. Biochem Biophys Res Commun 1985; 128: 739-745.
- JORGENSEN AO, SHEN AC, CAMPBELL KP: *Ultrastructural localization of calsequestrin in adult rat atrial and ventricular muscle cells*. J Cell Biol 1985; 101: 257-268.
- WIENZEK M, KATZ S: *Isolation and characterization of purified sarcoplasmic reticulum membranes from isolated adult rat ventricular myocytes*. J Mol Cell Cardiol 1991; 23: 1149-1163.
- MARTONOSI AN, PIKULA S: *The network of calcium regulation in muscle*. Acta Biochim Pol 2003; 50: 1-30.
- DHALLA NS, DAS PK, SHARMA GP: *Subcellular basis of cardiac contractile failure*. J Mol Cell Cardiol 1978; 10: 363-385.
- SCHWARTZ K, CHASSAGNE C, BOHELER, KR: *The molecular biology of heart failure*. J Am Coll Cardiol 1993; 22: 30A-33A.
- ARAI M, MATSUI H, PERIASAMY M: *Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure*. Circ Res 1994; 74: 555-564.
- DILLMANN WH: *Regulation of expression of cardiac sarcoplasmic reticulum proteins under pathophysiological conditions*. Mol Cell Biochem 1996; 157: 125-128.
- HASENFUSS G, PIESKE B: *Calcium cycling in congestive heart failure*. J Mol Cell Cardiol 2002; 34: 951-969.
- ALPERT NR, BROUSSEAU C, FEDERICO A, KRENZ M, ROBBINS J, WARSHAW DM: *Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 283: H1446-1454.
- VANNIER C, CHEVASSUS H, VASSORT G: *Ca-dependence of isometric force kinetics in single skinned ventricular cardiomyocytes from rats*. Cardiovasc Res 1996; 32: 580-586.
- PALMER S, KENTISH JC: *Roles of Ca²⁺ and cross-bridge kinetics in determining the maximum rates of Ca²⁺ activation and relaxation in rat and guinea pig skinned trabeculae*. Circ Res 1998; 83: 179-186.
- BAKER AJ, FIGUERO VM, KEUNG EC, CAMACHO SA: *Ca²⁺ regulates the kinetics of tension development in intact cardiac muscle*. Am J Physiol 1998; 275: H744-750.
- BENITAH JP, GOMEZ AM, VIRSOLVY A, RICHARD S: *New perspectives on the key role of calcium in the progression of heart disease*. J Muscle Res Cell Motil 2003; 24: 275-283.
- BEARD NA, LAVER DR, DULHUNTY AF: *Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle*. Prog Biophys Mol Biol 2004; 85: 33-69.
- BRITTSAN AG, KRANIAS EG: *Phospholamban and cardiac contractile function*. J Mol Cell Cardiol 2000; 32: 2131-2139.
- LEHNART SE, WEHRENS XH, KUSHNIR A, MARKS AR: *Cardiac ryanodine receptor function and*

- regulation in heart disease.* Ann N Y Acad Sci 2004; 1015: 144-159.
25. MARKS AR, TEMPST P, HWANG KS, TAUBMAN MB, INUI M, CHADWICK C, ET AL: *Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/ junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.* Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 8683-8687.
 26. OTSU K, WILLARD HF, KHANNA VK, ZORZATO F, GREEN NM, MACLENNAN DH: *Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum.* J Biol Chem 1990; 265: 13472-13483.
 27. TAKESHIMA H, YAMAZAWA T, IKEMOTO T, TAKEKURA H, NISHI M, NODA T, ET AL: *Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor.* EMBO J 1995; 14: 2999-3006.
 28. WAGENKNECHT T, SAMSO M: *Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors.* Front Biosci 2002; 7: d1464-1474.
 29. FRANZINI-ARMSTRONG C, JORGENSEN AO: *Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle.* Annu Rev Physiol 1994; 56: 509-534.
 30. ZHANG L, KELLEY J, SCHMEISSER G, KOBAYASHI YM, JONES LR: *Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane.* J Biol Chem 1997; 272: 23389-23397.
 31. MARX SO, REIKEN S, HISAMATSU Y, GABURIAKOVA M, GABURIAKOVA J, YANG YM, ET AL: *Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers.* J Cell Biol 2001; 153: 699-708.
 32. DORN GW, 2ND, FORCE T: *Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy.* J Clin Invest 2005; 115: 527-537.
 33. MARX SO, REIKEN S, HISAMATSU Y, JAYARAMAN T, BURKHOF D, ROSEMBLIT N, ET AL: *PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts.* Cell 2000; 101: 365-376.
 34. WEHRENS XH, MARKS AR: *Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease.* Trends Biochem Sci 2003; 28: 671-678.
 35. YANO K, ZARAIN-HERZBERG A: *Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties.* Mol Cell Biochem 1994; 135: 61-70.
 36. FRYER MW, STEPHENSON DG: *Total and sarcoplasmic reticulum calcium contents of skinned fibres from rat skeletal muscle.* J Physiol 1996; 493(Pt 2): 357-370.
 37. IKEMOTO N, RONJAT M, MESZAROS LG, KOSHITA M: *Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum.* Biochemistry 1989; 28: 6764-6771.
 38. KAWASAKI T, KASAI M: *Regulation of calcium channel in sarcoplasmic reticulum by calsequestrin.* Biochem Biophys Res Commun 1994; 199: 1120-1127.
 39. BEARD NA, SAKOWSKA MM, DULHUNTY AF, LAVER DR: *Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels.* Biophys J 2002; 82: 310-320.
 40. IKEMOTO N, ANTONIU B, KANG JJ, MESZAROS LG, RONJAT M: *Intravesicular calcium transient during calcium release from sarcoplasmic reticulum.* Biochemistry 1991; 30: 5230-5237.
 41. SCHMIDT AG, KADAMBI VJ, BALL N, SATO Y, WALSH RA, KRANIAS EG, ET AL: *Cardiac-specific overexpression of calsequestrin results in left ventricular hypertrophy, depressed force-frequency relation and pulsus alternans in vivo.* J Mol Cell Cardiol 2000; 32: 1735-1744.
 42. KNUDSON CM, STANG KK, JORGENSEN AO, CAMPBELL KP: *Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin).* J Biol Chem 1993; 268: 12637-12645.
 43. KNUDSON CM, STANG KK, MOOMAW CR, SLAUGHTER CA, CAMPBELL KP: *Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin).* J Biol Chem 1993; 268: 12646-12654.
 44. JONES LR, ZHANG L, SANBORN K, JORGENSEN AO, KELLEY J: *Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum.* J Biol Chem 1995; 270: 30787-30796.
 45. KIRCHHEFER U, NEUMANN J, BABA HA, BEGROW F, KOBAYASHI YM, REINKE U, ET AL: *Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing triadin 1.* J Biol Chem 2001; 276: 4142-4149.
 46. ZHANG L, FRANZINI-ARMSTRONG C, RAMESH V, JONES LR: *Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin.* J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 233-247.
 47. MACLENNAN DH, ABU-ABED M, KANG C: *Structure-function relationships in Ca²⁺ cycling proteins.* J Mol Cell Cardiol 2002; 34: 897-918.
 48. KORCZAK B, ZARAIN-HERZBERG A, BRANDL CJ, INGLES CJ, GREEN NM, MACLENNAN DH: *Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca²⁺-ATPase gene.* J Biol Chem 1988; 263: 4813-4819.
 49. ZARAIN-HERZBERG A, ALVAREZ-FERNANDEZ G: *Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase-2 gene: structure and transcriptional regulation of the human gene.* ScientificWorldJournal 2002; 2: 1469-1483.
 50. DODE L, DE GREEF C, MOUNTIAN I, ATTARD M, TOWN MM, CASTEELS R, ET AL: *Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. Promoter analysis and alternati-*

- ve splicing of the SERCA3 pre-mRNA. *J Biol Chem* 1998; 273: 13982-13994.
51. LYTTON J, ZARAIN-HERZBERG A, PERIASAMY M, MACLENNAN DH: *Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*. *J Biol Chem* 1989; 264: 7059-7065.
 52. GELEBART P, MARTIN V, ENOUF J, PAPP B: *Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 676-684.
 53. BOBE R, BREDOUX R, CORVAZIER E, ANDERSEN JP, CLAUSEN JD, DODE L, ET AL: *Identification, expression, function, and localization of a novel (sixth) isoform of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene*. *J Biol Chem* 2004; 279: 24297-24306.
 54. MACLENNAN DH, RICE WJ, GREEN NM: *The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases*. *J Biol Chem* 1997; 272: 28815-28818.
 55. MACLENNAN DH, KRANIAS EG: *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 566-577.
 56. BERS DM: *Cardiac excitation-contraction coupling*. *Nature* 2002; 415: 198-205.
 57. SHANNON TR, BERS DM: *Integrated Ca²⁺ management in cardiac myocytes*. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1015: 28-38.
 58. KAMISHIMA T, QUAYLE JM: *Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in cardiac and smooth muscle cells*. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 943-946.
 59. RICHARD S, PERRIER E, FAUCONNIER J, PERRIER R, PEREIRA L, GOMEZ AM, ET AL: *'Ca(2+)-induced Ca(2+) entry' or how the L-type Ca(2+) channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells*. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 90: 118-135.
 60. YANO M, IKEDA Y, MATSUZAKI M: *Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure*. *J Clin Invest* 2005; 115: 556-564.
 61. BRAUNWALD E, BRISTOW MR: *Congestive heart failure: fifty years of progress*. *Circulation* 2000; 102: IV14-23.
 62. LOWES BD, MINOBE W, ABRAHAM WT, RIZEQ MN, BOHLMAYER TJ, QUAIFFE RA, ET AL: *Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium*. *J Clin Invest* 1997; 100: 2315-2324.
 63. MIYATA S, MINOBE W, BRISTOW MR, LEINWAND LA: *Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart*. *Circ Res* 2000; 86: 386-390.
 64. MORANO I, HADICKE K, HAASE H, BOHM M, ERDMANN E, SCHAUB MC: *Changes in essential myosin light chain isoform expression provide a molecular basis for isometric force regulation in the failing human heart*. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1177-1187.
 65. NAKAO K, MINOBE W, RODEN R, BRISTOW MR, LEINWAND LA: *Myosin heavy chain gene expression in human heart failure*. *J Clin Invest* 1997; 100: 2362-2370.
 66. PAGANI ED, ALOUSI AA, GRANT AM, OLDER TM, DZIUBAN SW JR, ALLEN PD: *Changes in myofibrillar content and Mg-ATPase activity in ventricular tissues from patients with heart failure caused by coronary artery disease, cardiomyopathy, or mitral valve insufficiency*. *Circ Res* 1988; 63: 380-385.
 67. ALPERT NR, MULIERI LA, LITTEN RZ: *Functional significance of altered myosin adenosine triphosphatase activity in enlarged hearts*. *Am J Cardiol* 1979; 44: 946-953.
 68. HOUSER SR, MARGULIES KB: *Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure?* *Circ Res* 2003; 92: 350-358.
 69. BEUCKELMANN DJ, NABAUER M, ERDMANN E: *Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure*. *Circulation* 1992; 85: 1046-1055.
 70. GROSSMAN W, JONES D, MCLAURIN LP: *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. *J Clin Invest* 1975; 56: 56-64.
 71. GERDES AM, KELLERMAN SE, MOORE JA, MUFFLY KE, CLARK LC, REAVES PY, ET AL: *Structural remodeling of cardiac myocytes in patients with ischemic cardiomyopathy*. *Circulation* 1992; 86: 426-430.
 72. ZHU W, ZOU Y, SHIOJIMA I, KUDOH S, AIKAWA R, HAYASHI D, ET AL: *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy*. *J Biol Chem* 2000; 275: 15239-15245.
 73. WILKINS BJ, DAI YS, BUENO OF, PARSONS SA, XU J, PLANK DM, ET AL: *Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy*. *Circ Res* 2004; 94: 110-118.
 74. GOMEZ AM, VALDIVIA HH, CHENG H, LEDERER MR, SANTANA LF, CANNELL MB, ET AL: *Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure*. *Science* 1997; 276: 800-806.
 75. ZARAIN-HERZBERG A, RUPP H, ELIMBAN V, DHALLA NS: *Modification of sarcoplasmic reticulum gene expression in pressure overload cardiac hypertrophy by etomoxir*. *Faseb J* 1996; 10: 1303-1309.
 76. TAKIZAWA T, ARAI M, YOGUCHI A, TOMARU K, KURABAYASHI M, NAGAI R: *Transcription of the SERCA2 gene is decreased in pressure-overloaded hearts: A study using in vivo direct gene transfer into living myocardium*. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 2167-2174.
 77. BERS DM, EISNER DA, VALDIVIA HH: *Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and heart failure: roles of diastolic leak and Ca²⁺ transport*. *Circ Res* 2003; 93: 487-490.

78. LEHNART SE, SCHILLINGER W, PIESKE B, PRESTLE J, JUST H, HASENFUSS G: *Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure*. Ann NY Acad Sci 1998; 853: 220-230.
79. MEYER M, SCHILLINGER W, PIESKE B, HOLUBARSCH C, HEILMANN C, POSIVAL H, ET AL: *Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy*. Circulation 1995; 92: 778-784.
80. BERS DM: *Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function*. J Mol Cell Cardiol 2004; 37: 417-429.
81. LINDNER M, ERDMANN E, BEUCKELMANN DJ: *Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure*. J Mol Cell Cardiol 1998; 30: 743-749.
82. BRILLANTES AB, ONDRIAS K, SCOTT A, KOBRINSKY E, ONDRIASOVA E, MOSCHELLA MC, ET AL: *Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein*. Cell 1994; 77: 513-523.
83. MIYAMOTO MI, DEL MONTE F, SCHMIDT U, DISALVO TS, KANG ZB, MATSUI T, ET AL: *Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure*. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 793-798.
84. DEL MONTE F, WILLIAMS E, LEBECHE D, SCHMIDT U, ROSENZWEIG A, GWATHMEY JK, ET AL: *Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in a rat model of heart failure*. Circulation 2001; 104: 1424-1429.
85. SATO Y, KIRIAZIS H, YATANI A, SCHMIDT AG, HAHN H, FERGUSON DG, ET AL: *Rescue of contractile parameters and myocyte hypertrophy in calsequestrin overexpressing myocardium by phospholamban ablation*. J Biol Chem 2001; 276: 9392-9399.
86. MINAMISAWA S, HOSHIJIMA M, CHU G, WARD CA, FRANK K, GU Y, ET AL: *Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy*. Cell 1999; 99: 313-322.
87. IWANAGA Y, HOSHIJIMA M, GU Y, IWATATE M, DIETERLE T, IKEDA Y, ET AL: *Chronic phospholamban inhibition prevents progressive cardiac dysfunction and pathological remodeling after infarction in rats*. J Clin Invest 2004; 113: 727-736.
88. FARR MA, BASSON CT: *Sparking the failing heart*. N Engl J Med 2004; 351: 185-187.
89. LAITINEN PJ, BROWN KM, PIPPO K, SWAN H, DEVANEY JM, BRAHMBHATT B, ET AL: *Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia*. Circulation 2001; 103: 485-490.
90. SCOOTE M, WILLIAMS AJ: *The cardiac ryanodine receptor (calcium release channel): emerging role in heart failure and arrhythmia pathogenesis*. Cardiovasc Res 2002; 56: 359-372.
91. JANUARY CT, RIDDLE JM: *Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca²⁺ current*. Circ Res 1989; 64: 977-990.
92. VOLDERS PG, VOS MA, SZABO B, SIPIDO KR, DE GROOT SH, GORGELS AP, ET AL: *Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts*. Cardiovasc Res 2000; 46: 376-392.
93. TOMASELLI GF, MARBAN E: *Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure*. Cardiovasc Res 1999; 42: 270-283.
94. PAK PH, NUSS HB, TUNIN RS, KAAB S, TOMASELLI GF, MARBAN E, ET AL: *Repolarization abnormalities, arrhythmia and sudden death in canine tachycardia-induced cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol 1997; 30: 576-584.
95. POGWIZD SM, BERS DM: *Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure*. Trends Cardiovasc Med 2004; 14: 61-66.
96. POGWIZD SM, HOYT RH, SAFFITZ JE, CORR PB, COX JL, CAIN ME: *Reentrant and focal mechanisms underlying ventricular tachycardia in the human heart*. Circulation 1992; 86: 1872-1887.
97. WEHRENS XH, LEHNART SE, HUANG F, VEST JA, REIKEN SR, MOHLER PJ, ET AL: *FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death*. Cell 2003; 113: 829-840.
98. SCHLOTTHAUER K, BERS DM: *Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials*. Circ Res 2000; 87: 774-780.
99. PRIORI SG, NAPOLITANO C, MEMMI M, COLOMBI B, DRAGO F, GASPARINI M, ET AL: *Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*. Circulation 2002; 106: 69-74.
100. PRIORI SG, NAPOLITANO C, TISO N, MEMMI M, VIGNATI G, BLOISE R, ET AL: *Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*. Circulation 2001; 103: 196-200.
101. TISO N, STEPHAN DA, NAVA A, BAGATTIN A, DEVANEY JM, STANCHI F, ET AL: *Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2)*. Hum Mol Genet 2001; 10: 189-194.
102. KONTULA K, LAITINEN PJ, LEHTONEN A, TOIVONEN L, VIITASALO M, SWAN H: *Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: recent mechanistic insights*. Cardiovasc Res 2005; 67: 379-387.
103. TISO N, SALAMON M, BAGATTIN A, DANIELI GA, ARGENTON F, BORTOLUSSI M: *The binding of the RyR2 calcium channel to its gating protein FKBP12.6 is oppositely affected by ARVD2 and VTSIP mutations*. Biochem Biophys Res Commun 2002; 299: 594-598.