ESTABILIZACIÓN DEL RECEPTOR DE RIANODINA CARDÍACO COMO ESTRATEGIA PARA PREVENIR ARRITMIAS Y APOPTOSIS EN MODELOS QUE CURSAN CON PÉRDIDA DE CALCIO DEL RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO.

OBJETIVOS GENERALES

En miocitos cardiacos, un manejo adecuado del calcio (Ca^{2+}) intracelular es esencial para la ejecución de diversos procesos fisiológicos incluyendo la función contráctil. En contraste, las alteraciones en el manejo del Ca^{2+} han sido asociadas con disfunción contráctil, arritmias y muerte celular por apoptosis. Durante el acoplamiento excito contráctil cardiaco, el Ca^{2+} que entra a la célula a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes tipo L, gatilla la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplamático (RS) a través del mecanismo denominado liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} [1]. Este mecanismo es mediado por la apertura de los receptores de rianodina (RyR2) que cuando se abren promueven la liberación de una gran cantidad de Ca^{2+} hacia el citosol que es el necesario para la activación de las proteínas contráctiles que inducen la contracción [2]. La relajación ocurre cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular es restaurada a sus valores diastólicos debido fundamentalmente a la retoma de Ca^{2+} hacia el RS por la bomba de Ca^{2+} ATPasa denominada SERCA2a y por la extrusión de Ca^{2+} hacia el espacio extracelular por el intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX). Durante el periodo diastólico, los RyR2 no están completamente inactivos sino que permiten que una cierta cantidad de Ca^{2+} del RS se libere espontáneamente hacia el citosol. Esta liberación espontánea denominada pérdida de Ca^{2+} del RS o en inglés "*calcium leak*", se manifiesta como liberaciones de Ca^{2+} delimitadas espacialmente denominadas chispas de Ca^{2+} del inglés "*calcium sparks*" o si son mayores en magnitud, como liberaciones que se propagan espacialmente, denominadas ondas de Ca^{2+} del inglés "*calcium waves*". El Ca^{2+} liberado al citosol durante una onda de Ca^{2+} es extruido por el NCX que, al ser electrogénico, genera una corriente despolarizante denominada corriente despolarizante transitoria hacia adentro (*depolarizing transient inward current (Iti)*). En situaciones patológicas asociadas con la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular, las ondas de Ca^{2+} se multiplican y activan esta corriente, generando posdespolarizaciones tardías (DADs) que si alcanzan el umbral pueden gatillar potenciales de acción espontáneos y arritmias [3, 4]. Las ondas de Ca^{2+}, también pueden alterar la duración del potencial de acción y promover una heterogeneidad en la distribución del potencial de acción que constituye otro sustrato proarritmogénico [5]. Además, el exceso de ondas de Ca^{2+} ha sido asociado con la inducción de apoptosis a través de diversos mecanismos entre ellos, la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial o la activación de quinasas dependientes de Ca^{2+} que promueven la muerte celular [6-9]. Estos antecedentes indican el papel crítico que tiene la pérdida de Ca^{2+} del RS a través de los RyR2 en la arritmogénesis y en la muerte de los cardiomiocitos. En este contexto, la posibilidad de estabilizar farmacológicamente la función del RyR2 ha surgido como una potencial herramienta terapéutica para prevenir la pérdida de Ca^{2+} del RS [10-12]. El término estabilización se refiere a la posibilidad de reducir la pérdida espontanea de Ca^{2+} por el RyR2 durante el periodo diastólico sin afectar la liberación sistólica. De este modo, compuestos que estabilicen al RyR2 podrían ser usados para prevenir arritmias y muerte celular sin afectar el inotropismo.

Con esto en mente, el objetivo general del presente proyecto será **determinar el impacto del tratamiento "estabilizador" del RyR2 sobre las arritmias en un modelo de sobrecarga de Ca^{2+} inducida por digitálicos y en un modelo de disfunción contráctil asociada con sepsis.**

Recientemente hemos obtenido evidencias que la estabilización farmacológica del RyR2

al reducir la apertura diastólica del RyR2 es capaz de prevenir la muerte celular asociada con la sobrecarga de Ca^{2+} inducida por marcapaseo rápido [6]. **Examinar si la estabilización del RyR2 puede prevenir muerte celular asociada con el uso de digitálicos o aquella presente en un modelo de disfunción contráctil asociada con sepsis será otro de los desafíos del presente proyecto.**

La ejecución del presente proyecto en el que se realizarán experimentos *in vitro* con miocitos aislados e *in vivo* en modelos experimentales de intoxicación digitálica o de sepsis (peritonitis provocada por colocación de una cánula en el colon ascendente; CASP), aportará evidencia experimental que apoye el correcto y seguro avance de este prometedor enfoque terapéutico, basado en la estabilización farmacológica de los RyR2, que cobra interés como potencial tratamiento para el manejo y prevención de un amplio espectro de arritmias cardíacas y de muerte celular generadas por alteraciones en el manejo del Ca^{2+} intracelular [13, 14].
El abordaje del presente proyecto proveerá además, resultados de interés traslacional dado que la estabilización de los RyR2 podría resultar en una nueva estrategia para aumentar la ventana terapéutica de los digitálicos y para el tratamiento de pacientes sépticos con disfunción cardiaca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis de trabajo 1: La estabilización de los receptores de rianodina (RyR2) previene las arritmias inducidas por digitálicos sin reducir el efecto inotrópico positivo de estos agentes.

Hipótesis de trabajo 2: La estabilización de los RyR2 previene la apoptosis de cardiomiocitos cardiacos asociada con la intoxicación digitálica y con sepsis.

Para poner a prueba estas hipótesis se proponen los siguientes objetivos específicos:

1) Estudiar en cardiomiocitos de rata tratados con dosis arritmogénicas de digitálicos, la respuesta antiarritmogénica alcanzada con diferentes agentes farmacológicos capaces de reducir la pérdida diastólica espontánea de Ca^{2+} través de los RyR2. Evaluando en paralelo el impacto que cada uno produce sobre la respuesta inotrópica y longitud diastólica final. Los fármacos a utilizar serán: carvedilol, atenolol, VK-II-86 (análogo estructural del carvedilol, sin actividad β-bloqueante) y dantrolene.

2) En base a los resultados obtenidos en cardiomiocitos aislados seleccionar uno o más de los fármacos evaluados, para probar su eficacia antiarrítmica en un modelo murino de intoxicación digitálica *in vivo*.

3) Examinar en células humanas IPS diferenciadas a cardiomiocitos (hIPSc-CMs), si los digitálicos promueven efecto inotrópico positivo y arritmias y si estas últimas se pueden prevenir con los estabilizadores de los RyR2 sin afectar el inotropismo.

4) Determinar el rol que cumple la pérdida diastólica espontánea de Ca^{2+} en la ruta fisiopatológica que conduce a la muerte celular inducida por digitálicos y la asociada con sepsis.

5) Explorar si la estabilización del RyR2 previene la apoptosis inducida por intoxicación digitálica y por sepsis en ratones.

6) Verificar si la prevención de la apoptosis asociada con la intoxicación digitálica inducida por el uso de estabilizadores del RyR2 es extrapolable a un modelo celular de cardiomiocitos humanos.

7) Evaluar si los estabilizadores de los RyR2 son capaces de prevenir la apoptosis asociada con sepsis inducida por LPS en células hIPSc-CMs.

Es importante mencionar aquí que nuestros resultados preliminares en miocitos aislados (ver más adelante) así como antecedentes publicados [15] reafirman la factibilidad del objetivo específico No. 1, y sustentan la participación de los RyR2 en las alteraciones del Ca^{2+} intracelular y las arritmias asociadas con la intoxicación digitálica. Estos antecedentes sumados a los aportados por nuestro laboratorio mostrando que estabilizar los RyR2 con carvedilol o con su análogo no β-bloqueante, el VK-II-86 son capaces de prevenir la muerte celular inducida por marcapaseo rápido [6] y que tenemos resultados preliminares mostrando el éxito en el uso de células hIPSc-CMs en nuestro laboratorio son los pilares que nos motivan a concretar este proyecto y demuestran la necesidad de realizar los objetivos restantes en los que se evaluará la eficacia de los estabilizadores del RyR2 para prevenir las arritmias y la apoptosis en un modelo experimental de intoxicación digitálica y de sepsis. A su vez, es importante destacar una vez más, que

estrategias que estabilizan los RyR2 surgen como una potencial herramienta para prevenir la disfunción cardíaca asociadas con alteraciones en la función de los RyR2 [11, 16, 17]. Considerando la asociación directa en el grado de disfunción contráctil y la muerte de células cardiacas por apoptosis, examinar si la estabilización de los RyR2 mejora la viabilidad celular y por ende reduce la disfunción contráctil en sepsis, resulta de sumo interés traslacional y nos impulsa a concretar los objetivos No. 5 y 7.

Para poner a prueba la hipótesis de que la estabilización de los RyR2 previenen las arritmias y la muerte celular asociadas con la intoxicación digitálica y con sepsis realizaremos experimentos en miocitos aislados de ratas tratados con digitálicos o de ratones sépticos y sus controles sham así como en miocitos de ratones y células IPS humanas tratadas con digitálicos o con LPS para simular sepsis. Combinaremos medidas de contractilidad, de niveles Ca^{2+} intracelular, con estudios bioquímicos de la expresión, fosforilación y oxidación de los RyR2. Se evaluará el grado de apoptosis a través de la técnica de TUNEL y la detección de señales pro- y anti-apoptóticas. Adicionalmente se evaluará la actividad proarritmogénica a través de la determinación del grado de actividad espontánea (ondas de Ca^{2+} y contracciones espontáneas) de los miocitos y de electrocardiogramas *in vivo*.

Los resultados obtenidos nos permitirán definir la eficacia de los estabilizadores de los RyR2 para prevenir arritmias y muerte celular en patologías asociadas con la sobrecarga de Ca^{2+} celular (digitálicos) o para mejorar la supervivencia celular y por ende la función contráctil en patologías de alta prevalencia como sepsis.

RELEVANCIA DEL PROBLEMA

Los RyR2 cumplen un rol fundamental para la función cardíaca, ya que al abrirse en respuesta al ingreso de Ca^{2+} desde los canales tipo L sarcolemales durante el proceso denominado "liberación de calcio inducida por calcio", permite la descarga del contenido de este ión desde el RS hacia el citosol donde media la activación de las proteínas contráctiles [2]. Este canal es un complejo tetramérico que puede sufrir oxidación o fosforilación en sitios específicos [18], lo que conduce a un aumento en su probabilidad de apertura. Esta alteración funcional, que en condiciones fisiológicas tales como el estímulo adrenérgico forma parte de una respuesta inotrópica capaz de aumentar la fracción de eyección, puede también determinar la pérdida espontánea de Ca^{2+} contenido en el RS durante el período diastólico.

Los digitálicos o Glucósidos Cardiotónicos son inhibidores de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, que han sido utilizados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca por más de 200 años debido a que producen un efecto inotrópico positivo. Sin embargo, su estrecha ventana terapéutica, determinada principalmente por el riesgo de aparición de arritmias dificulta su uso farmacológico. Además de la posibilidad de su uso terapéutico, es importante tener en cuenta que diversos compuestos endógenos similares a la ouabaina o "*digital-like factors*" han sido identificados en humanos [19] y cumplen un importante rol en diferentes situaciones patológicas, como la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca congestiva [20] y la génesis de arritmias ventriculares [21].

La inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa deriva en acumulación de Na^+ intracelular que afecta secundariamente el funcionamiento del NCX, lo que resulta en un aumento del Ca^{2+} intracelular que media su efecto inotrópico positivo. Por otra parte, el aumento de Ca^{2+} intracelular es el mecanismo activador clásico de la proteína quinasa Ca^{2+}/calmodulina-dependiente tipo II (CaMKII) [22], una serina/treonina quinasa cuya isoforma δ es la predominante en el corazón [23], y que en trabajos previos de nuestro laboratorio ha sido identificada como mediadora de apoptosis en cardiomiocitos cultivados en presencia de ouabaina o digoxina [24] y como pieza clave en la génesis de arritmias durante la intoxicación digitálica [15]. En este contexto, la activación de CaMKII conduce a la hiperfosforilación de los RyR2 y esto aumenta la frecuencia de liberaciones espontáneas de Ca^{2+} desde el RS. La extrusión a través del NCX de este Ca^{2+} liberado en período diastólico genera una corriente despolarizante conocida como post-despolarización tardía, que de alcanzar el umbral, descargará un potencial de acción ectópico capaz de generar una taquicardia ventricular. Interesantemente, además de las arritmias, resultados de nuestro laboratorio muestran que CaMKII media la apoptosis inducida por digitálicos [24]. Sin embargo, si este efecto está relacionado con un aumento en la liberación de Ca^{2+} por los RyR2 inducida por su fosforilación dependiente de CaMKII aún no ha sido determinado.

Paralelamente, existen evidencias que muestran a las especies reactivas del oxígeno (ROS) como un mediador fundamental de apoptosis [25] y arritmias [26]; y diferentes estudios indican que los digitálicos pueden aumentar la producción de ROS [27] lo cual aumenta la pérdida espontánea de Ca^{2+} desde el RS mediante la oxidación directa de los RyR2 [17]. Más recientemente, el mismo grupo que demostró la existencia de oxidación directa del RyR2, encontró que la oxidación de CaMKII es un punto en común y principal determinante de la alteración funcional a nivel de los RyR2 [28].

Teniendo en cuenta la complejidad del mecanismo fisiopatológico activado por inhibición de la bomba Na^+/K^+, la dificultad que representa en la actualidad inhibir a una quinasa ubicua como CaMKII, y los resultados relativos de las terapias antioxidantes en la patología cardiovascular; consideramos necesario el estudio minucioso de la

estabilización de los RyR2 como una potencial estrategia terapéutica.
En esta dirección hay actualmente distintos grupos de investigación trabajando en la búsqueda de una molécula capaz de reducir selectivamente la pérdida espontánea de Ca^{2+} a través de los RyR2 sin afectar el acoplamiento éxito-contráctil. Hasta el momento las más estudiadas han sido Flecainida y JTV-519, que si bien logran estabilizar los RyR2 también afectan la función de canales de Na^{+} y Ca^{2+}. Esta falta de especificidad podría explicar por qué un estudio reciente con JTV-519 demostró su capacidad para reducir las arritmias inducidas por digitálicos, pero reduciendo el efecto inotrópico positivo alcanzado [29].
También en trabajos recientes, el grupo del Dr. Wayne Chen (Universidad de Calgary. Alberta, Canadá) con quien colaboramos estrechamente [6], demostró que el β-bloqueante, carvedilol, es capaz de reducir la pérdida diastólica de Ca^{2+} por los RyR2 y sintetizó un análogo sin efecto β-bloqueante (VK-II-86) capaz de estabilizar selectivamente los RyR2 [11]. El Dr. Chen demostró, usando preparaciones de RyR2 reconstituidos en membranas lipídicas, que el VK-II-86 reduce el tiempo medio de apertura pero aumenta la frecuencia de apertura de los RyR2. De esta manera, los RyR2 dejan pasar la misma cantidad de Ca^{2+} pero a expensas de abrirse durante menos tiempo, más veces [11]. En este trabajo se demostró además que el VK-II-86 es capaz de reducir las arritmias inducidas por sobrecarga de Ca^{2+} en un modelo CPVT en ratón.
Aunque el VK-II-86 actualmente se encuentra disponible comercialmente, el Dr. Chen se ha comprometido a proveernos cantidades necesarias de esta droga como para llevar adelante los experimentos propuestos.

Por otra parte, estudios recientes de nuestro laboratorio muestran que CaMKII es la mediadora de la disfunción contráctil asociada con sepsis [30]. Este cuadro es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica a la infección severa, y constituye la principal causa de muerte en pacientes en estado crítico. Se caracteriza por inflamación sistémica, reducción de la resistencia vascular periférica, aumento de la permeabilidad microvascular y disfunción contráctil cardiaca [31]. Usando un modelo de sepsis en ratones transgénicos que expresan un RyR2 no fosforilable por CaMKII demostramos que esta quinasa promueve la pérdida de Ca^{2+} por los RyR2, resultando en una reducción del contenido de Ca^{2+} del RS y por lo tanto una menor liberación sistólica responsable de la disfunción contráctil asociada con este síndrome. La sepsis además de cursar con disfunción contráctil, está asociada con un aumento en la incidencia de arritmias [32] y pérdida de cardiomiocitos por apoptosis [33]. Sin embargo, los mecanismos involucrados han sido menos estudiados. Un solo trabajo relacionó la pérdida de Ca^{2+} de los RyR2 con la elevada incidencia de arritmias [34]. En este trabajo, los autores mostraron que la administración de TNFα a miocitos cardiacos promueve un aumento en las chispas de Ca^{2+} indicativas de una aumentada pérdida de Ca^{2+} por los RyR2 en diástole. Este Ca^{2+} al ser removido hacia el espacio extracelular por el intercambiador NCX, como se mencionó previamente, puede inducir DADs que al alcanzar el umbral genera latidos ectópicos capaces de gatillar una arritmia ventricular. En este trabajo se demuestra que una alteración de los RyR2 es responsable de la actividad arritmogénica asociada con sepsis.
Aunque actualmente no existen trabajos que vinculen a los RyR2 con el aumento de apoptosis en sepsis, resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que ratones controles sometido a sepsis tiene aumentada la pérdida de Ca^{2+} del RS (ondas de Ca^{2+}) y la apoptosis en tanto que estos aumentos no se observan cuando la sepsis se induce en ratones mutantes en los que los RyR2 no pueden ser fosforilados por CaMKII (ver más adelante). Estos resultados sugieren que la liberación del Ca^{2+} por los RyR2 tendría un rol causal en la apoptosis asociada con sepsis. Sin embargo, no se estableció el mecanismo

responsable de esta alteración.

Las evidencias presentadas hasta aquí demuestran el potencial beneficio de conocer la regulación de los RyR2 con el objetivo de establecer nuevos blancos moleculares que permitan, a través del diseño de fármacos, mejorar la función cardiaca en patologías que cursen con alteraciones en la función de los RyR2. **Con este objetivo en mente, en este estudio examinaremos si la estabilización de los RyR2 resulta una estrategia válida para prevenir las arritmias y la apoptosis asociadas con la intoxicación digitálica y con el corazón séptico.**

RESULTADOS PRELIMINARES Y APORTES DEL GRUPO AL ESTUDIO DEL PROBLEMA EN CUESTIÓN

El desarrollo exitoso del presente proyecto se sustenta en una serie de resultados previos y preliminares del grupo de investigación. Desde hace varios años el laboratorio del investigador responsable está abocado al estudio de una línea de investigación que involucra el reconocimiento de mecanismos básicos responsables de la disfunción contráctil que presenta el miocardio en distintas situaciones fisiopatológicas y en particular, estudiar el rol que cumplen los RyR2 y su modulación [6, 15, 16, 24, 30, 35-37]. A partir de la obtención de un PICT 2007 se exploró el papel que juega el aumento del Na^+_i inducido por digitálicos en las arritmias del corazón insuficiente. Estos estudios brindaron importantes aportes a la comprensión de la función y regulación de los RyR2 por CaMKII en la insuficiencia cardíaca, en la isquemia y reperfusión [15, 24, 36, 37] y en la toxicidad digitálica. En un PICT 2011 examinamos la regulación de CaMKII por especies reactivas del oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) que dieron lugar a 2 trabajos, uno publicado en Cardiovascular Research en el que demostramos el impacto del óxido nítrico sobre los RyR2 en un modelo de hinchamiento osmótico de miocitos [16] y uno actualmente en revisión en la revista Journal of Molecular and Cellular Cardiology en el que examinamos el papel del NO y la CaMKII en la adaptación contráctil asociado con el ejercicio aeróbico. En este trabajo demostramos, en un modelo de ratones sometidos a 6 semanas de natación, que el IGF-1 liberado durante el ejercicio aumenta la producción de NO por una vía AKT-dependiente. Este NO activa por nitrosilación a la CaMKII que ejerce un efecto inotrópico positivo a través de la fosforilación de blancos a nivel de retículo sarcoplasmático. Más recientemente, y con el apoyo de un PICT 2014, publicamos dos trabajos más, uno en la revista Journal of Molecular and Cellular Cardiology donde demostramos el papel crítico de la pérdida de Ca^{2+} del RS debido a la fosforilación de los RyR2 por CaMKII en la apoptosis inducida por marcapaseo rápido [6] y otro en la revista Critical Care Medicine donde demostramos que la disfunción contráctil asociada con sepsis es mediada por la forforilación CaMKII-dependiente de los RyR2 que promueve la perdida de Ca^{2+} del RS y por ende un efecto inotrópico negativo [30]. Tomados en conjunto estos resultados demuestran el papel fundamental de los RyR2 en las arritmias y en la muerte celular asociadas con alteraciones en el manejo del Ca^{2+} intracelular y hacen del presente proyecto, que propone estudiar la estabilización de los RyR2 como estrategia para prevenir las arritmias y la apoptosis asociadas con la intoxicación digitálica y con el corazón séptico, la continuación natural de nuestra línea de investigación. El proyecto se sustenta además en una serie de resultados preliminares que demuestran su factibilidad. En este sentido, y teniendo en cuenta estudios recientes que muestran que el carvedilol y sus análogos de similar estructura química pero sin su acción β-bloqueante, son capaces de prevenir las arritmias inducidas por sobrecarga de Ca^{2+} del RS [11], realizamos experimentos en cardiomiocitos aislados para verificar si estos agentes, al reducir la probabilidad de apertura de los RyR2 podrían servir para prevenir las arritmias inducidas por digitálicos. En cardiomiocitos aislados de rata estimulados a 0.5 Hz y tratados con el digitálico ouabaina, observamos un aumento significativo en la fosforilación de los RyR2 y aparición de contracciones espontáneas, indicativas de actividad proarritmogénica [15]. Cuando realizamos experimentos similares en presencia de carvedilol, la frecuencia de aparición de contracciones espontáneas se redujo significativamente (Figura 1A). Para confirmar si la capacidad del carvedilol para prevenir la actividad espontánea inducida por ouabaina se debe a su capacidad de estabilizar los RyR2 y no a su efecto β-bloqueante, repetimos los experimentos; 1) en presencia de un bloqueante β estructuralmente distinto, el atenolol y 2) en presencia del análogo con mínima actividad β-bloqueante, el VK-II-86. Observamos que el atenolol no es capaz de prevenir las contracciones espontáneas

inducidas por ouabaina en tanto que el VK-II-86 reduce significativamente la frecuencia de contracciones espontáneas inducidas por ouabaina (Figura 1A). Estos resultados han sido presentados en forma de comunicaciones a congresos y fueron galardonados por el Premio "Prof. Dr. Luis Moledo 2013" al mejor trabajo de investigación básica en hipertensión arterial otorgado por el Consejo Argentino de Hipertensión Arterial. La Figura 1B muestra imágenes representativas y resultados promedio del efecto de ouabaina en presencia y ausencia de VK-II-86 sobre las frecuencia de ondas de Ca^{2+} medidas por microscopia confocal. La ouabaina produce un aumento significativo de la frecuencia de ondas de Ca^{2+} que es prevenido por VK-II-86. Los resultados sustentan la hipótesis de que el carvedilol podría ser más beneficioso que otros β-bloqueantes para prevenir las arritmias inducidas por digitálicos y nos estimulan a estudiar en mayor profundidad los mecanismos subcelulares involucrados en su acción antiarritmogénica. En este proyecto nos proponemos también utilizar dantrolene, ya que es un fármaco que gana importancia como estabilizador de los RyR2 [38, 39] y su efecto sobre estos canales depende de la interacción de los mismos con la proteína regulatoria Calmodulina. De este modo, los resultados obtenidos tendrían relevancia mecanística al comparar la eficacia alcanzada con cada grupo de estabilizadores en distintos escenarios fisiopatológicos.

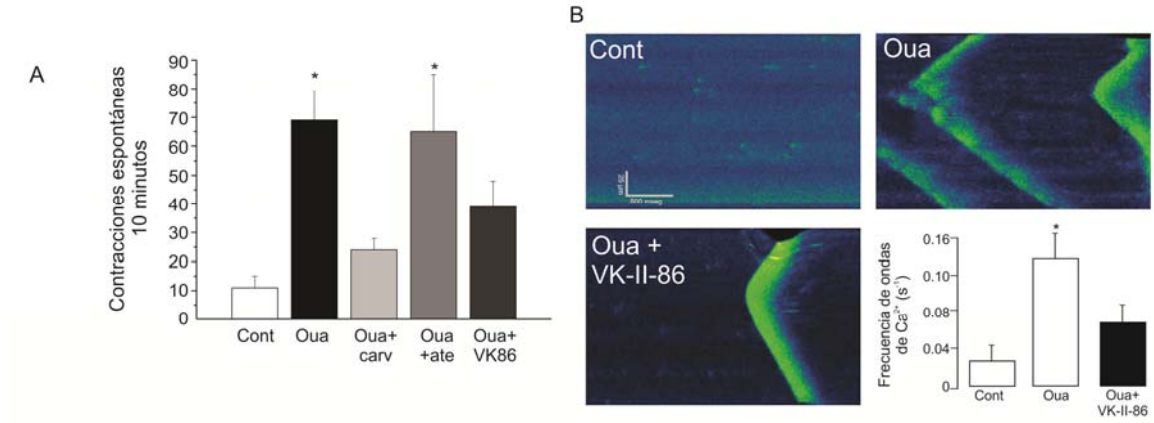

Figura 1: Contracciones espontáneas (A) y ondas de Ca^{2+} (B) de miocitos cardíacos aislados registradas con un detector de bordes y microscopía confocal, respectivamente. Se compararon miocitos tratados con ouabaina en presencia y ausencia de carvedilol, atenolol o VK-II-86.

Dado el potencial carácter traslacional que pueden tener los resultados de este proyecto, proponemos una serie de experimentos en células humanas IPS (induced Pluripotent Stem) diferenciadas a cardiomiocitos (hIPSc-CMs) con el objetivo de verificar si los resultados obtenidos con los estabilizadores en miocitos de rata se pueden reproducir en un modelo celular humano. Con este propósito, comenzamos una colaboración con el Dr. Santiago Miriuka, especialista en cultivos de células pluripotentes y mesenquimales diferenciadas a distintos tipos celulares. El Dr. Miriuka forma parte del grupo colaborador del presente proyecto y se ha comprometido a suministrar las hIPSc-CMs requeridas para el proyecto. De hecho, ya hemos estado trabajando con estas células para poner a punto el protocolo de medición de actividad espontánea e inotropismo en respuesta al digitálico, ouabaina. Como se observa en la Figura 2, pudimos detectar que la ouabaina aumenta la amplitud de la contracción así como la frecuencia de contracciones espontáneas en estas células, consistentemente con resultados publicados recientemente [40]. Actualmente

estamos repitiendo estos experimentos en presencia de carvedilol, VK-II-86 y atenolol, con resultados alentadores.

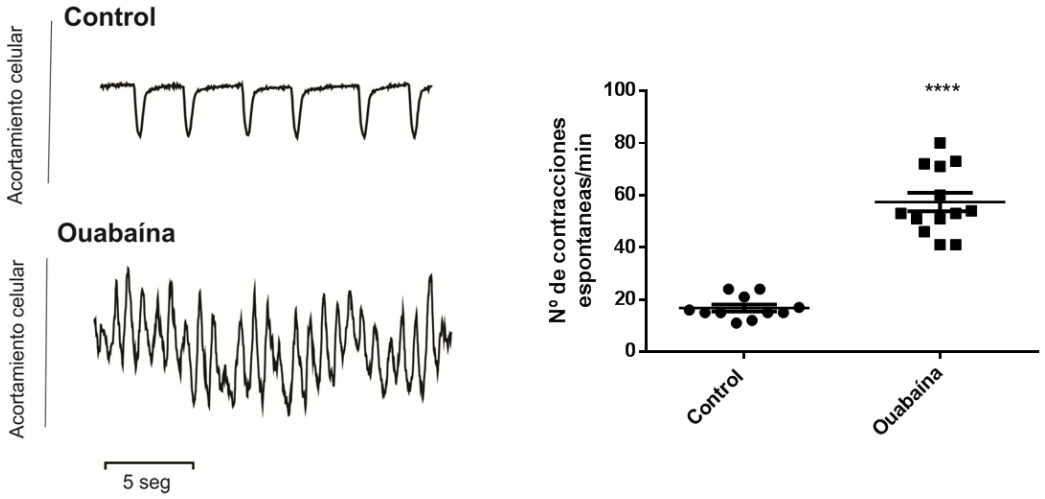

Figura 2: Trazos representativos (izquierda) y resultados promedio (derecha) del acortamiento en hIPS-CM incubadas en presencia o ausencia de Ouabaina (50 µM). Se observó un aumento significativo del porcentaje de acortamiento y de la frecuencia de contracciones espontáneas en las células incubadas con ouabaina comparadas con el grupo control.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio [24] demostramos que la estimulación crónica con dosis no arritmogénicas de ouabaina promueve apoptosis por un mecanismo dependiente de CaMKII. Aunque en este estudio no exploramos los mecanismos subcelulares involucrados, existe evidencia en la literatura demostrando la interacción fisiopatológica entre el RS y las mitocondrias [41]. En esta interacción las mitocondrias incorporan parte del Ca^{2+} liberado por el RS, con la consecuente sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} que es capaz de gatillar apoptosis celular en condiciones en las que la pérdida espontánea desde el RS está aumentada. Teniendo esto en cuenta, en el presente proyecto hipotetizamos que los estabilizares de los RyR2 también podrían ser eficaces para prevenir la muerte celular asociada con digitálicos. Consistentemente con esta hipótesis los resultados preliminares que se observan en la Figura 3 muestran que el carvedilol es capaz de reducir la muerte celular inducida por 24 horas de cultivo en presencia de ouabaina. Repetiremos estos experimentos utilizando atenolol, VK-II-86 y dantrolene, evaluando sus efectos sobre distintos índices de apoptosis.

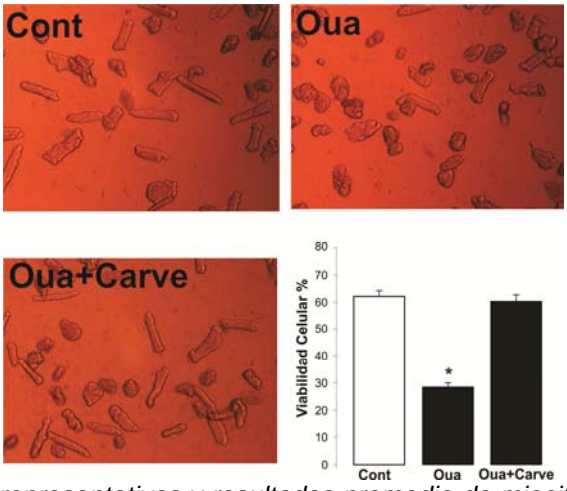

Figura 3: Imágenes representativas y resultados promedio de miocitos cultivados durante 24 horas en presencia y ausencia de 2 µM de ouabaina (oua) o ouabaina+Carvedilol (Oua+Carve). Los resultados muestran que el carvedilol es capaz de prevenir la muerte celular inducida por ouabaina (n=5 por grupo).

El presente proyecto también propone explorar el impacto de los estabilizadores de los RyR2 sobre las arritmias y la apoptosis asociada con sepsis. Utilizando un modelo experimental de sepsis, inducida por la colocación de una cánula en el colon ascendente (CASP; ver métodos), recientemente publicamos que la disfunción contráctil cardiaca observada en este modelo era debida a la fosforilación CaMKII-dependiente de los RyR2 que resulta en la perdida de Ca^{2+} del RS [30]. Los resultados preliminares que se presentan en la Figura 4 muestran que en este modelo, además de la disfunción contráctil, también está aumentada la actividad espontánea, proarritmogénica y que esta se asocia con un aumento de la pérdida de Ca^{2+} por los RyR2.

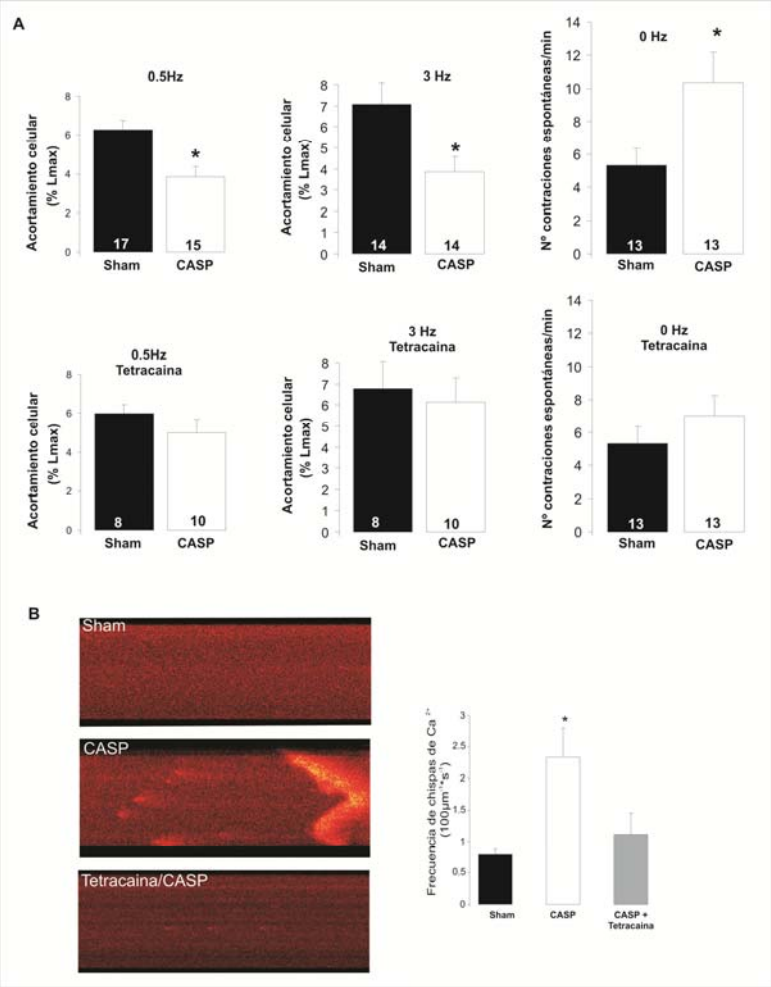

*Figura 4: El modelo de sepsis inducido por peritonitis (CASP) se asocia con disfunción contráctil aumento de contracciones espontáneas y aumento de la frecuencia de chispas de Ca^{2+}. **A:** resultados promedio mostrando que células aisladas de ratones CASP tienen reducido el acortamiento celular tanto a 0.5 como a 3 Hz y aumentado el número de contracciones espontáneas (sustrato proarritmogénico). Estas alteraciones son prevenidas en miocitos aislados de ratones CASP tratados con el estabilizador del RyR2, tetracaina. **B:** Imágenes representativas y resultados promedio mostrando que los miocitos CASP tiene aumentado el número de chispas de Ca2+, indicando un aumento de la pérdida de Ca2+ por el RyR2. Este aumento es prevenido por el tratamiento con tetracaina.*

Por otra parte, la figura 4 también muestra que el tratamiento de los ratones sépticos con tetracaina, un estabilizador de los RyR2 no relacionado químicamente con el carvedilol y el VK-II-86, es capaz de prevenir, al menos en parte, la disfunción contráctil y la actividad espontánea de los miocitos sépticos sin afectar la actividad contráctil y espontánea de miocitos sham. Es importante mencionar que la tetracaina es un anestésico que inhibe la corriente de Na^+. Sin embargo, a dosis bajas, ha sido demostrado que es capaz de reducir la probabilidad de apertura de los RyR2 y que es capaz de prevenir las arritmias inducidas por isoproterenol sin afectar su efecto inotrópico positivo [42]. Por otra parte, nosotros demostramos que la tetracaina, en dosis bajas, es capaz de prevenir la apoptosis inducida por taquicardia crónica, un proceso que depende de pérdida de Ca^{2+} por los RyR2 y CaMKII [6]. Dado los efectos inespecíficos de la tetracaina en el presente proyecto

usaremos los estabilizadores, VK-II-86 y dantrolene. Tomados en conjunto, estos resultados muestran que nuestro modelo de sepsis se asocia con disfunción contráctil, arritmias y pérdida de Ca^{2+} por los RyR2 y que estas alteraciones se pueden revertir usando tetracaina. Estos resultados preliminares sustentan la hipótesis de que modificaciones postraslacionales de los RyR2 contribuyen a la disfunción contráctil y a la elevada incidencia de arritmias asociadas con sepsis y que la estabilización de los RyR2 podría ser una estrategia eficaz para mejorar la función del corazón séptico. Con la ejecución del plan propuesto, confirmaremos estos resultados preliminares utilizando carvedilol y VK-II-86 como estabilizadores de los RyR2. Examinaremos además si este modelo experimental de sepsis tiene aumentada la apoptosis y de ser así, si la misma se puede prevenir estabilizando los RyR2. Consistentemente con la factibilidad de este objetivo, los resultados preliminares que se presentan en la Figura 5 muestran que ratones CASP tienen aumentada la apoptosis evaluada a través de la relación entre la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas Bcl2 y Bax, respectivamente. Interesantemente, esta apoptosis está reducida en ratones CASP mutantes que expresan un receptor de RyR2 no fosforilable por CaMKII dado que el sitio de fosforilación serina 2814 ha sido mutado a alanina (Ser2814a), indicando que los RyR2 están implicados en la apoptosis asociada con sepsis. Por otra parte y sustentando la hipótesis de que la estabilización de los RyR2 es capaz de prevenir la apoptosis en ratones sépticos, el tratamiento de los ratones con otro agente conocido por tener la propiedad de estabilizar los RyR2, el dantrolene [14], previno el aumento de los índices apoptóticos asociados con sepsis. Estos experimentos se repetirán usando Carvedilol, VK-II-86 y atenolol. El estudio del impacto de los estabilizadores de los RyR2 sobre las arritmias y la apoptosis asociada con sepsis constituye la columna vertebral del plan de beca posdoctoral de la becaria de CONICET, Dra. Marisa Sepúlveda, que forma parte del grupo colaborador del plan propuesto.

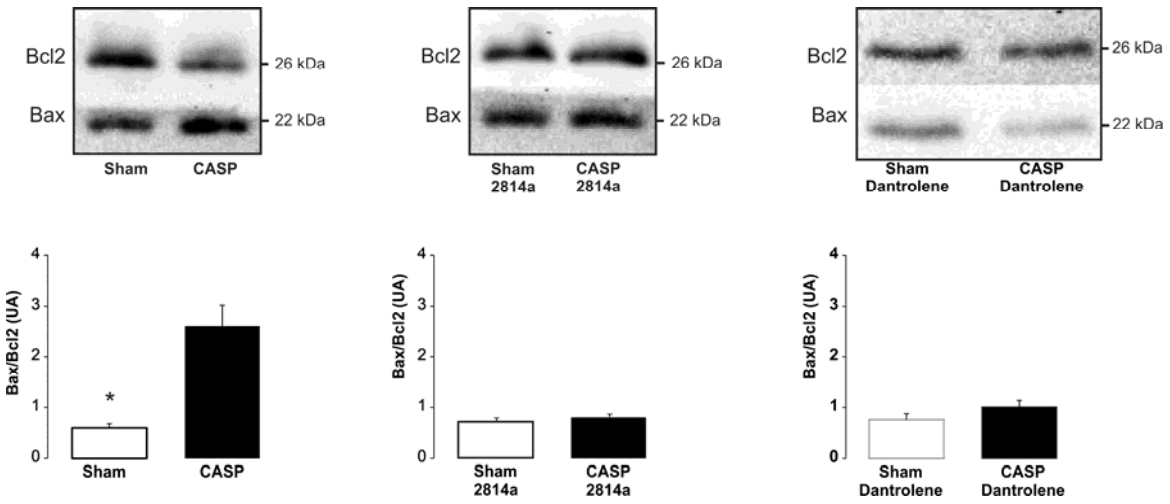

Figura 5: Blots representativos y resultados promedio mostrando que los corazones sépticos (CASP) tiene aumentado el índice de apoptosis Bax/Bcl2 con respecto a sus controles sham (panel izquierdo). Este aumento no se observa en corazones de ratones sépticos que tienen el RyR2 mutado (CASP 2814a) de modo que no puede ser forforilado por CaMKII (panel central). El aumento de la relación Bax/Bcl2 también se previene pretratando a los ratones con el estabilizador del RyR2, dantrolene, previamente a la cirugía Sham y CASP (panel derecho) (n=4 corazones por grupo).

DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOS

Dividiremos las actividades a desarrollar en 2 etapas, una primera que estará centrada en el estudio de la prevención de arritmias inducidas por digitálicos y asociadas con sepsis. Aquí estudiaremos por microscopia confocal el impacto de los estabilizadores de los RyR2 sobre las chispas y ondas de Ca^{2+} inducidas por digitálicos y asociadas con sepsis. Además, estudiaremos a nivel de miocitos aislados de rata, ratón y células hIPSc-CMs si los digitálicos y la sepsis se asocian con contracciones y liberaciones de Ca^{2+} espontáneas como índice de un sustrato proarritmogénico, al mismo tiempo que examinaremos el efecto de las distintas intervenciones sobre la función diastólica y el inotropismo. En base a los resultados obtenidos en cardiomiocitos aislados seleccionaremos uno o más de los fármacos evaluados, para probar su eficacia antiarrítmica en un modelo murino de intoxicación digitálica y de sepsis *in vivo*. En una segunda etapa se realizarán experimentos para determinar si los estabilizadores de los RyR2 son efectivos para prevenir la apoptosis asociada con la administración crónica de digitálicos y aquella asociada con sepsis. Para ello estudiaremos apoptosis en presencia y ausencia de estabilizadores de los RyR2 por métodos bioquímicos e imunohistoquímicos en miocitos cultivados en presencia de ouabaina o miocitos aislados de ratones sépticos y sus controles sham. Realizaremos experimentos similares en células hIPSc-CMs cultivadas en presencia de digitálicos o luego de la administración de LPS para simular la sepsis [43].

En el presente proyecto, los experimentos con animales serán realizados de acuerdo con las normas de la Guía de Mantenimiento y Uso de Animales de Laboratorio (NIH Publicación No. 85-23, revisada en 1996)

Diseño experimental:

Para cumplir con los objetivos propuestos:

Objetivos 1 y 2: El proceso de liberación espontánea de Ca^{2+} que podemos monitorear mediante técnicas de fluorescencia en tiempo real se manifiesta con dos fenómenos ampliamente estudiados: chispas de Ca^{2+} que son liberaciones locales y transitorias desde un pequeño grupo de RyR2; y ondas de Ca^{2+} que representan la propagación del proceso de liberación por activación de los RyR2 que responden al aumento de Ca^{2+} liberado por RyR2 vecinos. Su principal correlato fisiopatológico son las arritmias por actividad gatillada, ya que las ondas de Ca^{2+} generan oscilaciones en el potencial de membrana al activar al NCX, que genera una corriente despolarizante o post-despolarización tardía, capaz de iniciar un potencial de acción desde un foco ectópico de descarga. De esta forma esperamos que una intervención que reduzca la frecuencia o duración de las "chispas de Ca^{2+}" sea capaz de dificultar la generación de "ondas de Ca^{2+}" (lo cual será evaluado en cardiomiocitos aislados) y con esto disminuir la probabilidad de arritmias producidas por intoxicación digitálica en ratones monitoreados por electrocardiograma. Otra consecuencia negativa de la liberación diastólica de Ca^{2+} es el incremento en la tensión diastólica del músculo cardíaco, que deteriora la relajación y con ello el llenado ventricular. En este sentido, hipotetizamos que la estabilización de los RyR2 será una estrategia eficaz para prevenir la disfunción diastólica generada por el tratamiento inotrópico. Este parámetro será estudiado mediante la medición de la longitud diastólica final en cardiomiocitos aislados. Dado que nuestros resultados previos demuestran que CaMKII juega un rol causal en los alteraciones de los RyR2 asociadas con los efectos deletéreos de los digitalicos y de sepsis [15, 30], realizaremos ensayos bioquímicos para determinar si los estabilizadores de los RyR2 afectan la actividad de CaMKII. Estos experimentos nos permitirán definir si al menos parte del efecto beneficioso de los estabilizadores de los RyR2 es debido a que rompen el círculo vicioso que

involucra activación de CaMKII-aumento de la pérdida de Ca^{2+} del RS-aumento de Ca^{2+} diastólico-mayor actividad de CaMKII.

Tomados en conjunto, los experimentos propuestos nos permitirán definir la eficacia de los estabilizadores de los RyR2 para prevenir las arritmias y la disfunción diastólica asociada con el uso de digitálicos y establecer las bases para una nueva estrategia que involucre el uso de digitálicos en combinación de estabilizadores de los RyR2 que permita ampliar la ventana terapéutica para estos agentes en la clínica.

Objetivo 3: Realizaremos experimentos en células humanas IPS diferenciadas a cardiomiocitos (hIPSc-CMs) tratadas con ouabaina en presencia y ausencia de los agentes estabilizadores de los RyR2 en las que mediremos amplitud de acortamiento y actividad contráctil espontánea. Esperamos encontrar que estas células humanas respondan a la ouabaina de modo similar a lo observado en miocitos de rata es decir, con un aumento en la amplitud de acortamiento y en la frecuencia de contracciones espontáneas, indicativo de un sustrato proarritmogénico y que este sustrato se pueda prevenir con los estabilizadores de los RyR2 como el carvedilol, el VK-II-86 y/o dantrolene pero no así con β-bloqueantes clásicos como el atenolol. Estos experimentos serán una primera aproximación al potencial que pueden tener estos estabilizadores para prevenir arritmias en el corazón humano.

Objetivo 4: Ha sido ampliamente demostrada la interacción fisiopatológica entre el RS y las mitocondrias [41]. En esta interacción las mitocondrias incorporan parte del Ca^{2+} liberado por el RS, con la consecuente sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} que es capaz de gatillar apoptosis celular en condiciones en las que la pérdida espontánea desde el RS está aumentada. Nuestro grupo ha confirmado que los digitálicos son capaces de inducir la pérdida de cardiomiocitos por apoptosis aún en concentraciones sub-arritmogénicas [15] y nuestros resultados preliminares confirman que la apoptosis está aumentada en el modelo de sepsis en ratón inducida por peritonitis. En el marco de este objetivo, para determinar el rol que cumple la pérdida diastólica espontánea de Ca^{2+} en la ruta fisiopatológica que conduce a la muerte celular inducida por digitálicos y la asociada con sepsis evaluaremos por microscopia confocal si el tratamiento con digitálicos o los miocitos sépticos tiene aumentadas la frecuencia de chispas y ondas de Ca^{2+} y si estas se asocian con un aumento del Ca^{2+} mitocondrial y con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que conduce a la apoptosis. Verificaremos si estas alteraciones en el manejo del Ca^{2+} y en la función mitocondrial se pueden prevenir con la administración de estabilizadores de los RyR2.

Objetivo 5: Examinaremos si el tratamiento con digitálicos o los corazones sépticos tiene exacerbada la apoptosis y si el tratamiento con estabilizadores reduce los índices apoptóticos. Se evaluará viabilidad celular mediante caracterización morfológica y se medirá apoptosis mediante las técnicas de TUNEL, activación de caspasas, liberación del citocromo c y la relación entre las proteínas anti- y pro-apoptóticas, Bax y Bcl2, respectivamente. Estos experimentos permitirán corroborar los resultados preliminares mostrados en la figura 4, en los que se muestra que la estimulación crónica con ouabaina reduce la viabilidad celular y la estabilización de los RyR2 con carvedilol la previene. Nuestros resultados preliminares midiendo viabilidad celular (Figura 4) sugieren que éste es el caso. Sin embargo, se requiere la determinación directa de apoptosis (TUNEL, liberación de citocromo c) para su confirmación. Repetiremos estos experimentos usando VK-II-86 y atenolol. Además, corroboraremos los resultados preliminares mostrados en la

figura 5 en los que se muestra que el estabilizador de los RyR2, dantrolene reduce la apoptosis asociada con sepsis y repetiremos los experimentos midiendo apoptosis previo tratamiento de los animales sépticos con carvedilol, VK-II-86 y atenolol. Los resultados obtenidos aquí nos permitirán definir si los estabilizadores de los RyR2 son capaces de reducir la apoptosis asociada con sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial.

Objetivos 6 y 7: Para determinar si la capacidad de los estabilizadores de los RyR2 para prevenir la apoptosis inducida por digitálicos o asociada con sepsis es operativa en células hIPSc-CMs, se cultivarán estas células durante 24 horas en presencia de 50 µM de ouabaina o con 1 µM LPS para simular la sepsis. Estos experimentos se realizarán en presencia y ausencia de carvedilol, VK-II-86, dantrolene y atenolol. Luego de 24 horas se examinará la viabilidad celular por el método morfométrico y se evaluará apoptosis por inmunohistoquímica y por Western Blot. Estos experimentos serán una aproximación al potencial que pueden tener estos estabilizadores para prevenir la apoptosis asociada con la intoxicación digitálica o con sepsis en el corazón humano.

Tomados en conjunto, los experimentos propuestos nos permitirán testear *in vivo* e *in vitro* la hipótesis de que la estabilización de los RyR2 es eficaz para reducir las arritmias y la apoptosis asociadas con la intoxicación digitálica y con el corazón séptico. Además, permitirán definir si los estabilizadores que actúan afectando la interacción con calmodulina como el dantrolene son más o menos eficaces que aquellos que actúan directamente con los RyR2 como el VK-II-86. Este estudio podría proporcionar nuevas estrategias que amplíen la ventana terapéutica de los digitálicos y que permitan reducir su alta tasa de mortalidad asociada con sepsis.

Metodología:
Se realizarán experimentos en miocitos aislados por digestión enzimática con colagenasa, de acuerdo a lo descrito previamente [36] en células cultivadas y en animales *in vivo*. Estos métodos se realizan diariamente en el laboratorio desde hace más de 5 años. Los experimentos se realizarán usando ratas wistar y ratones silvestres c57 y transgénicos con el sitio de fosforilación dependiente de CaMKII, serina 2814, mutado a alanina (Ser2814a).
Modelo experimental de sepsis: Para inducir la sepsis se llevará a cabo la cirugía de peritonitis por cánula en el colon ascendente (CASP) técnica puesta a punto en nuestro laboratorio [30]. Esta técnica consiste en la perforación del colon ascendente con una cánula por la cual fluyen heces hacia el peritoneo induciendo peritonitis. La cirugía simulada (Sham) se llevará a cabo usando el mismo procedimiento quirúrgico, pero sin implantación de la cánula. Esta técnica ha sido puesta a punto por la Dra. Marisa Sepúlveda, becaria posdoctoral, integrante de grupo colaborador.
Aislamiento de miocitos: Los miocitos de rata y ratón serán aislados enzimáticamente, de acuerdo a la técnica que se realiza de rutina en nuestro laboratorio [16, 35].
Células humanas IPS: Elegimos utilizar estas células porque son cada vez más reconocidas como de gran valor para el modelado de enfermedades cardiovasculares en seres humanos, especialmente síndromes de arritmias [44]. Para ello, contamos con una colaboración con el Laboratorio de Investigación Aplicada a las Neurociencias (LIAN) en el Instituto Fleni dirigido por el Dr. Santiago Miriuka. Su grupo de trabajo es especialista en cultivos de células pluripotentes y mesenquimales diferenciadas a distintos tipos celulares. A fin de cumplir con el cuarto y quinto objetivo nos proveerán células IPS humanas diferenciadas a cardiomiocitos según el protocolo de diferenciación propuesto por Paul W. Burridge y colaboradores [45].
Medidas de contractilidad, y $Ca^{2+}{}_i$ en miocitos aislados: El $Ca^{2+}{}_i$ será determinado por

epifluorescencia, técnica que se realiza también diariamente en nuestro laboratorio [15, 16, 24, 30, 35, 36]. Con el propósito de monitorear en tiempo real las características del ciclado de Ca^{2+} citosólico, se realizarán experimentos funcionales mediante microscopía de epifluorescencia en cardiomiocitos aislados estimulados a 0.5 Hz. Las células serán incubadas durante 12 minutos a temperatura ambiente con el indicador sensible a Ca^{2+} Fura-2, en una concentración de 10 μM.

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

Las células ya cargadas serán colocadas sobre la platina de un microscopio invertido Nikon Diaphot 200 adaptado para la técnica de epifluorescencia. Las mismas serán perfundidas a un flujo constante de 1 ml/minuto y estimuladas eléctricamente a 0.5 Hz.

Para obtener una señal fluorescente sensible a Ca^{2+} citosólico, la muestra será iluminada mediante una lámpara de Xenón, filtrando el haz de luz para excitar a dos longitudes de onda (340 nm y 380 nm) en forma alternada. La fluorescencia emitida por las células se registrará a >510 nm y amplificará por un fotomultiplicador. La excitación alternada con dos longitudes de onda permite calcular un cociente entre la señal emitida por el indicador cuando es excitado con luz de 340 nm de longitud de onda (en estas condiciones la emisión varía según se encuentre o no interactuando con moléculas de Ca^{2+}) y la señal emitida cuando es excitado con luz de 380 nm de longitud de onda (en esta condición la intensidad de señal emitida es independiente de la interacción entre moléculas de fluoróforo y Ca^{2+}). La obtención de este cociente permite normalizar la señal fluorescente adquirida por la cantidad de moléculas de fluoróforo que se encuentran en condiciones de emitir señal fluorescente a lo largo del experimento, evitando artefactos derivados del foto-apagado del fluoróforo, de su pérdida de la célula así como también de un cambio de foco de la muestra.

Con el propósito de medir el acortamiento celular, se generará contraste óptico entre los bordes celulares y el fondo de la cámara de perfusión. La célula a estudiar será iluminada con luz roja (640-750 nm) a través de un sistema óptico para luz visible. De esta forma se logra la videodetección de bordes celulares permitiendo registrar la longitud y monitorear el acortamiento de los cardiomiocitos. Los datos adquiridos serán almacenados en un software adecuado (ION Optix análisis) para su posterior análisis.

La becaria postdoctoral, Malena Morell, que forma parte del grupo colaborador, realizará los experimentos que requieren este método dado que ya tiene experiencia comprobable en la medición de acortamiento y Ca^{2+} intracelular en miocitos aislados [16, 30].

Registros de fluorescencia por microscopía confocal: *Ca^{2+} citosólico:* Para obtener imágenes confocales de Ca^{2+} citosólico, las células serán cargadas con el indicador fluo-3-AM durante 10 min (concentración final 10 μM) de acuerdo a la técnica previamente utilizada por el investigador responsable [46] y puesta a punto en el microscopio confocal ZEIS 410 del Centro de Investigaciones Cardiovasculares [6, 15, 16]. En breve, los miocitos serán visualizados en el microscopio confocal, montado sobre un microscopio invertido. El fluo-3 será excitado a 488 nm utilizando un láser de argón y la fluorescencia será recolectada por un fotomultiplicador, a 515-565 nm. Las imágenes de los transitorios de Ca^{2+} y de los eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} por los RyR2 denominadas chispas o *sparks* de Ca^{2+} y ondas de Ca^{2+}, serán obtenidas escaneando una línea orientada sobre el

eje mayor del miocito. Las imágenes serán procesadas usando el software Image J.
Ca^{2+} mitocondrial: Para las mediciones de Ca^{2+} mitocondrial, usaremos el indicador fluorescente Rhod-2/AM que se compartamentaliza en las mitocondrias [47]. Las mitocondrias serán identificadas marcando las células durante 60 minutos con el marcador de mitocondrias, Mito Tracker Green (MTG) a una concentración final de 200 nM. El MTG será excitado con el láser de argón a 488 nm y la fluorescencia emitida recolectada a 525-550 nm. Una vez identificada las mitocondrias serán escaneadas nuevamente y la fluorescencia roja emitida a 565 nM será considerada como una medida del Ca^{2+} mitocondrial.
Potencial de la membrana mitocondrial: Para determinar el potencial de la membrana mitocondrial, las células serán cargadas durante 20 min con el indicador tetra-metil-rodamina-metilester (TMRM) a una concentración final de 30 nM. Las células serán excitadas a 568 nm y la emisión será recogida a 580 nm [48].
Liberación de citocromo c: Para poder clasificar los miocitos individuales en apoptóticos o no apoptóticos, uno de los métodos que usaremos será la medida de la liberación del citocromo c por microscopia confocal. Para ello las células serán fijadas en 4 % paraformaldehido y permeabilizadas con tritón X-100 al 0.1%. El anticuerpo monoclonal anti-citocromo c se usará en conjunto con el anticuerpo secundario conjugado con el marcador fluorescente, isotiocianato de fluoresceína, para visualizar la inmunofluorescencia del citocromo c. Las imágenes confocales serán obtenidas excitando las células con un láser de argón de 488 nm. Las células con una distribución punteada (mitocondrial) del citocromo c serán consideradas no apoptóticas y aquellas con una distribución homogénea (citoplasmática) serán consideradas apoptóticas [49]. El Dr. Luis Gonano, integrante del grupo responsable, que regresó en 2017 de realizar un entrenamiento de un año en el Dr. Peter Jones en Nueva Zelanda, especialista en estructura y función de los RyR2 [50, 51] realizará los experimentos que requieran microscopia confocal dado que tiene experiencia documentable en el uso de esta técnica [15, 16].
Preparación de muestras para Western blot: Corazones sépticos o sham así como miocitos tratados con ouabaina serán lavados y congelados en nitrógeno líquido obteniéndose luego homogenatos, fracciones citosólicas y membranas del RS como se ha descripto previamente [42]. Se determinará la concentración de proteínas por medio del método de Bradford usando albúmina bovina como estándar. Las muestras se analizarán por Western blot. Estos experimentos en los que se medirá expresión y actividad de proteínas y quinasas vinculadas con el manejo de Ca^{2+} intracelular serán ejecutados por el Becario de CONICET, Juan Ignacio Burgos, que integra el grupo colaborador.
Evaluación de arritmias: En miocitos de animales sépticos, sham o tratados con ouabaina, la propensión al desarrollo de arritmias serán estimadas por el número de eventos contráctiles o liberaciones de Ca^{2+} (ondas o *waves* de Ca^{2+}) en ausencia de marcapaseo eléctrico. Estas contracciones espontáneas o las ondas de Ca^{2+} asociadas, han sido usadas por varios grupos incluido el nuestro, como un índice de arritmias inducidas por DAD's [15, 52].
Electrocardiograma (ECG) in vivo. EGC's de superficie serán registrados en ratones sépticos y ratones sham, usando electrodos de ECG asociados al sistema de adquisición PowerLab 4ST. Para que los ratones se puedan mover libremente durante el registro del ECG usaremos un sistema que diseñamos en el laboratorio que consiste en colocarle al ratón un chaleco que contiene los electrodos del ECG. Este sistema permite registrar exitosamente el ECG con el ratón en movimiento durante más de una hora [15].
Las arritmias serán determinadas cuantificando el número de latidos ectópicos y la incidencia

de taquicardia ventricular sostenida. Se utilizarán ratones BALB/c machos (8-12 semanas), que serán tratados con ouabaina 10 mg/kg intraperitoneal en dosis única. Registrando por electrocardiograma a los 20 minutos de la inyección durante una hora[15]. Una subpoblación de estos ratones será co-tratada con uno de los agentes evaluados como estabilizadores de los RyR2 en miocitos aislados para evaluar su eficacia en un modelo animal i*n vivo*. Los registros electrocardiográficos serán realizados también en ratones sépticos y sham, pre-tratados con los estabilizadores de los RyR2 (carvedilol y VK-II-86). Esperamos encontrar que los modelos sépticos tengan aumentadas las arritmias y que las intervenciones realizadas para inhibir las modificaciones postraslacionales de loa RyR2 prevengan total o parcialmente los eventos arrítmicos.

Medida del grado de apoptosis: Se utilizará la técnica histoquímica de TUNEL (TdT-mediated x-dUTP nick end labeling), que detecta y localiza in situ, la fragmentación del DNA por DNAasas endógenas. Ventrículos de ratones sépticos y ratones sham serán removidos y fijados en un buffer de formalina al 10% y luego sumergidos en parafina de acuerdo a los procedimientos estándares. Secciones de 3µm de espesor se obtendrán para realizar el ensayo de TUNEL, utilizando un kit comercial (ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon). Los miocitos marcados positivamente con la técnica de TUNEL serán contados en 10 campos al azar de secciones medioventriculares. Además, se realizará inmunodetección de las proteínas pro-apoptóticas caspasa-3 y Bax, y de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL con anticuerpos específicos. El grado de apoptosis también se evaluará en cultivos celulares de miocitos aislados tratados con TNFα, utilizando la tinción de TUNEL y usando un indicador fluorescente de caspasa-3 activada (Phyphilux). Tanto el ensayo de TUNEL como la detección de señales involucradas en la cascada de la apoptosis, son técnicas actualmente utilizadas en nuestro laboratorio [6, 24, 35, 36]. La becaria postdoctoral Marisa Sepúlveda, que forma parte del grupo colaborador, estará dedicada a este objetivo dado que ya tiene experiencia comprobable en la medición de índices apoptóticos [6].

Análisis estadístico: Los datos serán expresados como la Media ± Error Standard de la Media. Para comparaciones estadísticas se utilizará el Test de Student para datos apareados o desapareados o ANOVA, según corresponda. Las diferencias serán consideradas significativas a $p < 0.05$.

Limitaciones:

La presente propuesta está centrada en el estudio del impacto de los estabilizadores de los RyR2 sobre las arritmias y apoptosis asociadas con el uso de digitálicos y con el corazón séptico. Una limitación de este estudio es que en la actualidad el uso de digitálicos en la clínica médica es escaso, estando su uso restringido solo a casos de pacientes con fibrilación auricular o como inotrópicos en estadios avanzados de insuficiencia cardiaca. Sin embargo, el estudio de los mecanismos de acción de las arritmias inducidas por digitálicos y los modos de prevenirlas siguen siendo objeto de amplia investigación [53-55] debido a que los mecanismos involucrados en las arritmias inducidas por digitálicos son comunes a los de arritmias asociadas con patologías que cursan con alteraciones en el manejo del Ca^{2+} intracelular. Por otra parte su estudio permitiría no solo establecer nuevos blancos antiarritmogénicos sino además encontrar mecanismos que permitan ampliar la ventana terapéutica de estos fármacos haciéndolos más eficaces para el tratamiento de IC. Por otra parte, para el estudio de las arritmias y la apoptosis en sepsis, hemos elegido un modelo fisiológico de sepsis inducido por peritonitis (CASP). El problema con elegir un modelo en animal entero es que es posible que las alteraciones observadas a nivel cardiaco tengan origen a nivel sistémico. Sin embargo nuestros estudios previos indican que esta disfunción afecta directamente a la

contractilidad a nivel del miocito [30]. Otra desventaja de este modelo es que al momento de estudiar la eficacia de los estabilizadores de los RyR2, los resultados obtenidos, podrían ser debido a efectos extra-cardiacos de los mismos. Por este motivo decidimos usar un modelo celular de sepsis inducida por LPS en el que podremos usar los estabilizadores directamente sobre los miocitos. Consideramos que contrastar los resultados en el animal entero con los obtenidos en miocitos aislados tratados con LPS nos permitirá salvar esta limitación.

Referencias:

1. Fabiato, A. and F. Fabiato, *Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells.* J Physiol, 1975. **249**(3): p. 469-95.
2. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling.* Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
3. Ferrier, G.R., *Digitalis arrhythmias: role of oscillatory afterpotentials.* Prog Cardiovasc Dis, 1977. **19**(6): p. 459-74.
4. Eisner, D.A., et al., *What role does modulation of the ryanodine receptor play in cardiac inotropy and arrhythmogenesis?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(4): p. 474-81.
5. Xie, L.H. and J.N. Weiss, *Arrhythmogenic consequences of intracellular calcium waves.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(3): p. H997-H1002.
6. Sepulveda, M., et al., *Role of CaMKII and ROS in rapid pacing-induced apoptosis.* J Mol Cell Cardiol, 2013. **63**: p. 135-45.
7. Koval, O.M., et al., *CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(11): p. 4996-5000.
8. Di Carlo, M.N., et al., *CaMKII-dependent phosphorylation of cardiac ryanodine receptors regulates cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury.* J Mol Cell Cardiol, 2014. **74**: p. 274-83.
9. Ruiz-Meana, M., C. Fernandez-Sanz, and D. Garcia-Dorado, *The SR-mitochondria interaction: a new player in cardiac pathophysiology.* Cardiovasc Res, 2010. **88**(1): p. 30-9.
10. Hwang, H.S., et al., *Inhibition of cardiac Ca2+ release channels (RyR2) determines efficacy of class I antiarrhythmic drugs in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.* Circ Arrhythm Electrophysiol, 2011. **4**(2): p. 128-35.
11. Zhou, Q., et al., *Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca2+ release.* Nat Med, 2011. **17**(8): p. 1003-9.
12. Wehrens, X.H., et al., *Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2.* Science, 2004. **304**(5668): p. 292-6.
13. Bers, D.M., *Stabilizing ryanodine receptor gating quiets arrhythmogenic events in human heart failure and atrial fibrillation.* Heart Rhythm, 2017. **14**(3): p. 420-421.
14. Acsai, K., et al., *Antiarrhythmic potential of drugs targeting the cardiac ryanodine receptor Ca2+ release channel: case study of dantrolene.* Curr Pharm Des, 2015. **21**(8): p. 1062-72.
15. Gonano, L.A., et al., *Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias.* Circ Arrhythm Electrophysiol, 2011. **4**(6): p. 947-57.
16. Gonano, L.A., et al., *Hypotonic swelling promotes nitric oxide release in cardiac ventricular myocytes: impact on swelling-induced negative inotropic effect.* Cardiovasc Res, 2014. **104**(3): p. 456-66.
17. Ho, H.T., et al., *Arrhythmogenic adverse effects of cardiac glycosides are mediated by redox modification of ryanodine receptors.* J Physiol, 2011. **589**(Pt 19): p. 4697-708.
18. Meissner, G., *Regulation of mammalian ryanodine receptors.* Front Biosci, 2002. **7**: p. d2072-80.
19. Gottlieb, S.S., et al., *Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure.* Circulation, 1992. **86**(2): p. 420-5.
20. Bagrov, A.Y. and J.I. Shapiro, *Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications.* Nat Clin Pract Nephrol, 2008. **4**(7): p. 378-92.

21. Bagrov, A.Y., et al., *Effect of endogenous digoxin-like factor and digoxin antibody on myocardial Na+, K(+)-pump activity and ventricular arrhythmias in acute myocardial ischaemia in rats.* Cardiovasc Res, 1993. **27**(6): p. 1045-50.
22. De Koninck, P. and H. Schulman, *Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca2+ oscillations.* Science, 1998. **279**(5348): p. 227-30.
23. Hoch, B., et al., *Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium.* Circ Res, 1999. **84**(6): p. 713-21.
24. Sapia, L., et al., *Na+/K+-ATPase inhibition by ouabain induces CaMKII-dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes.* J Mol Cell Cardiol, 2010. **49**(3): p. 459-68.
25. Colucci, W.S., *Apoptosis in the heart.* N Engl J Med, 1996. **335**(16): p. 1224-6.
26. Xie, L.H., et al., *Oxidative-stress-induced afterdepolarizations and calmodulin kinase II signaling.* Circ Res, 2009. **104**(1): p. 79-86.
27. Liu, J., et al., *Ouabain interaction with cardiac Na+/K+-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na+ and Ca2+ concentrations.* J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 27838-44.
28. Ho, H.T., et al., *Ryanodine receptor phosphorylation by oxidized CaMKII contributes to the cardiotoxic effects of cardiac glycosides.* Cardiovasc Res, 2014. **101**(1): p. 165-74.
29. Sacherer, M., et al., *JTV519 (K201) reduces sarcoplasmic reticulum Ca(2)(+) leak and improves diastolic function in vitro in murine and human non-failing myocardium.* Br J Pharmacol, 2012. **167**(3): p. 493-504.
30. Sepulveda, M., et al., *Calcium/Calmodulin Protein Kinase II-Dependent Ryanodine Receptor Phosphorylation Mediates Cardiac Contractile Dysfunction Associated With Sepsis.* Crit Care Med, 2017. **45**(4): p. e399-e408.
31. Remick, D.G., *Pathophysiology of sepsis.* Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1435-44.
32. Schwartz, A., et al., *Association between Hypophosphatemia and Cardiac Arrhythmias in the Early Stage of Sepsis: Could Phosphorus Replacement Treatment Reduce the Incidence of Arrhythmias?* Electrolyte Blood Press, 2014. **12**(1): p. 19-25.
33. Chopra, M. and A.C. Sharma, *Distinct cardiodynamic and molecular characteristics during early and late stages of sepsis-induced myocardial dysfunction.* Life Sci, 2007. **81**(4): p. 306-16.
34. Duncan, D.J., et al., *TNF-alpha and IL-1beta increase Ca2+ leak from the sarcoplasmic reticulum and susceptibility to arrhythmia in rat ventricular myocytes.* Cell Calcium, 2010. **47**(4): p. 378-86.
35. Palomeque, J., et al., *Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca2+ dependence of Ca2+-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species.* Circ Res, 2009. **105**(12): p. 1204-12.
36. Vila-Petroff, M., et al., *CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury.* Cardiovasc Res, 2007. **73**(4): p. 689-98.
37. Bell, J.R., M. Vila-Petroff, and L.M. Delbridge, *CaMKII-dependent responses to ischemia and reperfusion challenges in the heart.* Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 96.
38. Walweel, K., Y.W. Oo, and D.R. Laver, *The emerging role of calmodulin regulation of RyR2 in controlling heart rhythm, the progression of heart failure and the antiarrhythmic action of dantrolene.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2017. **44**(1): p. 135-142.
39. Hartmann, N., et al., *Antiarrhythmic effects of dantrolene in human diseased cardiomyocytes.* Heart Rhythm, 2017. **14**(3): p. 412-419.
40. Guo, L., et al., *Estimating the risk of drug-induced proarrhythmia using human*

induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Toxicol Sci, 2011. **123**(1): p. 281-9.
41. Lopez-Crisosto, C., et al., *Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology.* Nat Rev Cardiol, 2017. **14**(6): p. 342-360.
42. Venetucci, L.A., et al., *Reducing ryanodine receptor open probability as a means to abolish spontaneous Ca2+ release and increase Ca2+ transient amplitude in adult ventricular myocytes.* Circ Res, 2006. **98**(10): p. 1299-305.
43. Wang, Y., et al., *beta(1)-adrenoceptor stimulation promotes LPS-induced cardiomyocyte apoptosis through activating PKA and enhancing CaMKII and IkappaBalpha phosphorylation.* Crit Care, 2015. **19**: p. 76.
44. Lu, H.R., et al., *Application of optical action potentials in human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes to predict drug-induced cardiac arrhythmias.* J Pharmacol Toxicol Methods, 2017.
45. Burridge, P.W., et al., *Chemically defined generation of human cardiomyocytes.* Nat Methods, 2014. **11**(8): p. 855-60.
46. Petroff, M.G., et al., *Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca2+ release in cardiomyocytes.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(10): p. 867-73.
47. Collins, T.J., et al., *Mitochondrial Ca(2+) uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca(2+) signals.* J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26411-20.
48. Maack, C., et al., *Elevated cytosolic Na+ decreases mitochondrial Ca2+ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes.* Circ Res, 2006. **99**(2): p. 172-82.
49. Eigel, B.N., H. Gursahani, and R.W. Hadley, *Na+/Ca2+ exchanger plays a key role in inducing apoptosis after hypoxia in cultured guinea pig ventricular myocytes.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(4): p. H1466-75.
50. Gonano, L.A. and P.P. Jones, *FK506-binding proteins 12 and 12.6 (FKBPs) as regulators of cardiac Ryanodine Receptors: Insights from new functional and structural knowledge.* Channels (Austin), 2017: p. 1-11.
51. Zhang, J.Z., H.M. Waddell, and P.P. Jones, *Regulation of RYR2 by sarcoplasmic reticulum Ca(2+).* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015. **42**(6): p. 720-6.
52. Curran, J., et al., *Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II.* J Mol Cell Cardiol, 2010. **49**(1): p. 25-32.
53. Frommeyer, G., et al., *Ivabradine Reduces Digitalis-induced Ventricular Arrhythmias.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2017.
54. Alp, H., et al., *Protective effects of Hawthorn (Crataegus oxyacantha) extract against digoxin-induced arrhythmias in rats.* Anatol J Cardiol, 2015. **15**(12): p. 970-5.
55. Trenti, A., et al., *Cardiac glycoside ouabain induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via a JNK-dependent decrease of Bcl-2.* Biochem Pharmacol, 2014. **89**(2): p. 197-209.

Cronograma de Actividades

Se presenta una tabla de doble entrada con las tareas desagregadas y los tiempos estimados para su ejecución.

Tareas	1er semestre	2do semestre	3er semestre	4to semestre	5to semestre	6to semestre
Exp. *In vitro*	Caracterización de la función contráctil, y manejo del Ca^{2+} intracelular en el modelo celular de intoxicación digitálica	Caracterización de la función contráctil y manejo del Ca^{2+} intracelular en el modelo de sepsis evaluando la presencia de arritmias	Experimentos para verificar los estabilizadores del RyR2 previenen las arritmias inducidas por digitálicos y por sepsis	Medidas de arritmias en células hIPSc-CMs tratadas con ouabaina y con LPS. En presencias y ausencia de estabilizadores del RyR2		Medidas de viabilidad celular y apoptosis en células hIPSc-CMs tratadas con ouabaina y con LPS. En presencia y ausencia de estabilizadores del RyR2
Exp. *In vivo*	Medidas de ECG para determinación de arritmias en animales sometidos a intoxicación digitálica con y sin estabilizadores del RyR2.	Medidas de ECG para determinación de arritmias en animales sépticos y sham con y sin estabilizadores del RyR2.			Experimentos para evaluar si estabilizar losl RyR2 previene la apoptosis asociada con digitálicos y sepsis.	
Exp. de microscopia confocal		Experimentos midiendo de chispas y ondas de Ca en miocitos tratados con digitálicos con y sin estabilizadores del RyR2.	Mediciones de chispas de Ca y contenido de Ca de RS en miocitos sépticos y sham con y sin estabilizadores del RyR2.	Mediciones en células tratadas con ouabaina y LPS de Ca y potencial de membrana mitocondrial y citocromo C con y sin y los estabilizadores del RyR2.		Evaluación de si la estabilización del RyR2 reduce las chispas de Ca^{2+} y la disfunción contráctil asociadas con sepsis
Exp. Bioquímicos		Western blots para evaluar el efecto de digitálicos sobre la expresión y forforilación de proteína involucradas en el manejo de Ca^{2+} intracelular.	Western blots para evaluar la expresión y forforilación de proteínas involucradas en el manejo de Ca^{2+}i en corazones sépticos y sham.		Ensayos para determinar índices apoptóticos en presencia de digitálicos y en sepsis.	Determinar si la estabilización del RyR2 previene la apoptosis asociada con digitálicos y sepsis.